

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Efectos del fitoplancton tóxico procedente de aguas continentales y
marinas en ecosistemas salobres de estuario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana D' Ors de Blas

Director

Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



**EFFECTOS DEL FITOPLANCTON TÓXICO
PROCEDENTE DE AGUAS CONTINENTALES Y
MARINAS EN ECOSISTEMAS SALOBRES DE
ESTUARIO**

TESIS DOCTORAL

ANA D'ORS DE BLAS

Madrid, septiembre de 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología

**EFFECTOS DEL FITOPLANCTON TÓXICO
PROCEDENTE DE AGUAS CONTINENTALES Y
MARINAS EN ECOSISTEMAS SALOBRES DE
ESTUARIO**

Memoria para optar al título de

Doctor en Veterinaria.

Presenta: Ana D'Ors de Blas

DIRECTOR: Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

Madrid, septiembre de 2015



El Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez, Profesor Titular del departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

HACE CONSTAR:

- 1) Que la Tesis presentada por Ana D'Ors de Blas titulada "Efectos del fitoplancton tóxico procedente de aguas continentales y marinas en ecosistemas salobres de estuario" ha sido realizada en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo su Dirección.
- 2) Que autoriza su presentación para que la doctoranda pueda obtener el título de Doctor.

Y para que así conste, lo firma en Madrid a quince de junio de dos mil quince.

Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez, Prof. Titular de Toxicología

Dpto. de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria. UCM

...pues somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no porque la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.

Bernardo de Chartres.

Dice Umberto Eco que al director de tesis no se le nombra en los agradecimientos, porque está haciendo su trabajo, pero tened por seguro que esta tesis no existiría sin el trabajo, el tesón, el cariño, la experiencia, y el buen hacer del Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez. Es a él a quién va destinado mi primer y más profundo agradecimiento. Porque para mí ha sido un verdadero Maestro, y porque estoy convencida de que con más gente como él, la sociedad y la ciencia serían mucho mejores.

A los gigantes (y más aún a las gigantas) sobre cuyos hombros he trepado. A los que conocí sólo por su obra, y a los que de primera mano me “contagiaron de ciencia”. Gracias por haberme enseñado tantas cosas.

A María, Mauricio, Mónica, Rocío, Héctor, Lara, y muchos más que en uno u otro momento caminaron a mi lado, con mis mismas dudas. A las Cármenes (la de lejos y la cerca) que tuvieron siempre palabras de ánimo para mí. A Andrés, porque un día miraremos hacia atrás y nos reiremos de todo.

A Rafa, Charlie, Inés, Cristina, Eugenia y a todos los que desde el otro lado de la pantalla recogieron el testigo de aguantarme, ayudarme, apoyarme, aconsejarme y alegrarme, cuando caminaba sola. Culpo a twitter de mis altas expectativas con la sociedad.

A mi familia, en especial a mis padres, por darme raíces, y también alas. Por empujar y sostener esta locura mía que también es vuestra. A la memoria de mi abuela, porque sin los cuidados tampoco hay ciencia.

A mis amigos de fuera de la secta científica, sobre todo a los que no preguntaron nunca que cuánto me faltaba para acabar. A los que entendieron qué implicaba todo esto del doctorado, y también a los que no. A Tote por los abrazos, las sonrisas y también las palmaditas en la espalda.

A mi hija Joana, que me ha regalado tiempo y atención para dedicarlo a este trabajo (y a Peppa Pig que me ha ayudado a negociarlo). Porque descubrir el mundo e intentar comprenderlo son dos caras de la misma moneda.

Y a Jorge, porque con su magia todo es posible. Te tero.

A Joana.

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
2. SUMMARY.....	15
3. INTRODUCCIÓN	19
3.1. IMPORTANCIA ECOLÓGICA DEL FITOPLANCTON	21
3.2. AFLORAMIENTOS DE MICROALGAS: UN PROBLEMA CON MÚLTIPLES CAUSAS Y CONSECUENCIAS.	22
3.3. PRODUCCIÓN DE TOXINAS	26
3.4. <i>Artemia franciscana</i> , MODELO DE ZOOPLANCTON.	28
3.5. LOS ESTUARIOS: UN SISTEMA COMPLEJO Y DINÁMICO.	32
4. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA	37
5. ARTÍCULOS PUBLICADOS	41
5.1. Toxic effects induced by salt stress on selected freshwater prokaryotic and eukaryotic microalgal species.....	43
5.2. Toxic risk associated with sporadic occurrences of <i>Microcystis aeruginosa</i> blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on <i>Artemia franciscana</i> nauplii populations.	51
5.3. Importance of strain type to predict the toxicological risk associated with <i>Microcystis aeruginosa</i> blooms: comparision of Microtox® analysis and immunoassay.....	59
5.4. Salinity changes and osmotic stress in marine phytoplankton species.	69
5.5. Risk associated with toxic blooms of marine phytoplankton functional groups on <i>Artemia franciscana</i>	99
6. DISCUSIÓN	107
6.1 AFLORAMIENTOS Y SALINIDAD.	108

6.2 MICROTOX® COMO MÉTODO ESTANDARIZADO DE UTILIDAD EN AFLORAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS	113
6.3 FITOPLANCTON MARINO EN EL ESTUARIO	115
7. CONCLUSIONES	119
8. BIBLIOGRAFÍA	123
FUENTES DE LAS IMÁGENES.....	131

1. RESUMEN

El papel del fitoplancton marino y continental como productor primario, fijador de nutrientes y base de las redes tróficas ha sido ampliamente reconocido y estudiado, aunque existe mucha menos información sobre su rol como vector de toxicidad en los ecosistemas. Las cianobacterias, dinoflagelados o diatomeas productores de toxinas suelen cobrar relevancia en eventos no cíclicos con consecuencias ecológicas, económicas y sociales, en el ambiente en el que aparezcan (afloramientos y mareas rojas).

Los estuarios son ecosistemas de transición entre el agua dulce y salada, donde estas floraciones explosivas de fitoplancton tóxico cobran gran importancia. Esto es debido al delicado equilibrio que se establece en ellas a lo largo de los ciclos diarios de mareas y los cambios de temperatura, descarga de agua dulce y evaporación por las variaciones interanuales. Tanto el fitoplancton tóxico de agua dulce como el de agua salada tienen acceso a ellos y pueden ocasionar problemas, alterando sus procesos ecológicos.

Esta tesis está claramente dividida en dos partes, para intentar estudiar diferentes aspectos de las dinámicas de los microorganismos fotosintéticos en el estuario, englobando cuatro artículos publicados y uno más en publicación.

En la primera parte nos centramos en el fitoplancton tóxico de agua dulce, trabajando con ocho cepas de *Microcystis aeruginosa* y una clorofita no tóxica (*Dictyosphaerium chlorelloides*) a modo de control. En el primer artículo observamos las consecuencias sobre su fisiología y crecimiento de la exposición a concentraciones crecientes de sal, similares al medio presente en el estuario (aguas salobres). En el segundo trabajando con *Artemia franciscana* como modelo de zooplancton comprobamos las consecuencias de la exposición a las cepas tóxicas y a sus extractos. En el tercero comparamos un ensayo comercial de bioluminiscencia bacteriana con otros métodos, aplicado a la predicción del riesgo toxicológico en afloramientos de cianobacterias.

En la segunda parte trabajamos con una diatomea (*Nitzschia sp.* N1C1) y dos dinoflagelados (*Prorocentrum lima* y *Alexandrium minutum*) productores de toxina y la clorofita no tóxica *Tetraselmis suecica* de control, como representantes del

fitoplancton marino. En el primer trabajo (en publicación) exponemos a los microorganismos fotosintéticos a medios de concentración salina decreciente (similares a las presentes en las zonas altas del estuario, con gran importancia del vertido de agua continental) para comprobar cómo responden fotosíntesis y crecimiento al estrés osmótico. En el segundo trabajo y con el mismo modelo de zooplancton que para el plancton de agua dulce, probamos su exposición a las diferentes especies tóxicas, así como a posibles afloramientos mixtos entre las especies marinas estudiadas.

Todos los trabajos realizados han puesto de manifiesto que los afloramientos de microalgas tóxicas son un problema real en los estuarios, ya que toleran sus condiciones de salinidad y a las concentraciones a las que aparecen suponen un riesgo para el zooplancton, por lo que la monitorización de estos eventos es necesaria tanto con fines ecológicos como de salud pública.

2. SUMMARY

The role of marine and continental phytoplankton in primary production, nutrients fixation and base of food webs has been widely recognized and studied. However there is much less information on its role as toxicity vector in ecosystems. Toxic cyanobacteria, dinoflagellates or diatoms usually become relevant in non-cyclical events (blooms and red tides) with ecological, economic and social consequences in the environment.

Estuaries are transition systems, between freshwater and saltwater, where these explosive blooms of toxic phytoplankton can modify the delicate balance that is set along them daily tidal cycles and temperature changes, download freshwater and evaporation interannual variations. Toxic freshwater and saltwater phytoplankton has the access to them and can cause problems, disrupting their ecological processes.

This thesis is clearly divided into two parts, to study the dynamics of photosynthetic organisms in the estuary, encompassing four published articles and one in press.

In the first part we focus on toxic freshwater phytoplankton, working with eight strains of *Microcystis aeruginosa* and a nontoxic chlorophyte (*Dictyosphaerium chlorelloides*) as a control. In the first article we look at the consequences on the physiology and growth of increasing concentrations of salt, similar to the medium present in the estuary (brackish water). In the second, working with *Artemia franciscana* as a model of zooplankton we check the consequences of exposure to toxic strains and their extracts. In the third we compared a commercial test for bacterial bioluminescence with other methods applied to the prediction of toxicological concern in cyanobacterial blooms.

In the second part, as representatives of marine phytoplankton we work with a toxic diatom (*Nitzschia spp.* N1C1) and two toxic dinoflagellates (*Prorocentrum lima* and *Alexandrium minutum*) and also a non-toxic control chlorophyte (*Tetraselmis suecica*). In the first study (in press) this photosynthetic microorganisms are exposed to decreasing salt concentrations (similar to those present in the higher areas of the estuary, with great importance of continental water discharge) to see the photosynthesis and growth response to osmotic stress. In the second work with the

same model of zooplankton than the previous paper, we tested their exposure to toxic phytoplankton species, as well as possible mixed blooms between marine species studied.

Our results show that the upwelling of harmful algal blooms could be a real problem in estuaries, because some organisms involved tolerate conditions of salinity and their concentrations can suppose a risk to zooplankton, so that monitoring of these events is necessary for both ecological and public health purposes .

3. INTRODUCCIÓN

3.1. IMPORTANCIA ECOLÓGICA DEL FITOPLANCTON

El fitoplancton es el componente autótrofo de la comunidad planctónica. Engloba al conjunto polifilético de microorganismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Comprende procariotas (cianobacterias), protistas (dinoflagelados) y eucariotas (clorofíceas), que se encuentran formando parte de todos los ecosistemas acuáticos del planeta, marinos y continentales (Kirk, 1994), habitando cerca de la superficie de la columna de agua, dónde captan la luz necesaria para la fotosíntesis.

Estos microorganismos juegan un importante papel en el equilibrio global del planeta. A través de la fotosíntesis oxigénica reducen carbono inorgánico (CO_2 y carbonatos) a carbono orgánico (azúcares), en un proceso conocido como producción primaria, que es la base de la mayoría de las cadenas tróficas en los sistemas acuáticos, marinos y continentales. Durante este proceso se desprende también oxígeno, que se libera a la atmósfera terrestre y queda disponible para otros organismos aerobios de la biosfera.

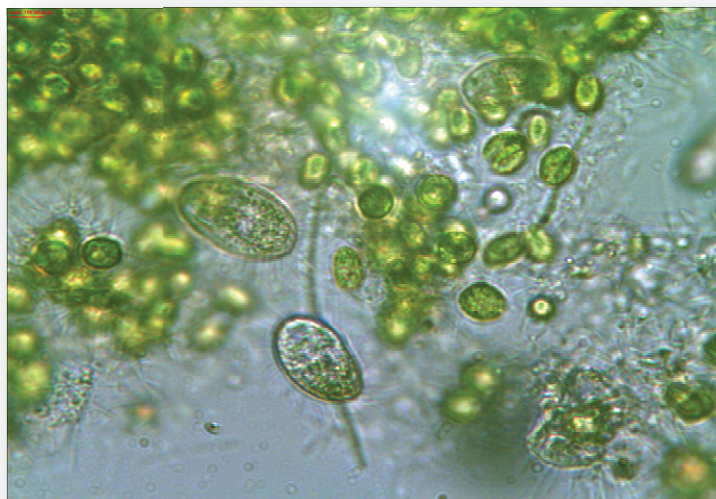


FIGURA 3.1 (A) MICROALGAS Y ROTÍFEROS, EJEMPLO DE ECOSISTEMA MICROSCÓPICO ACUÁTICO

Aproximadamente la mitad de la producción primaria total del planeta se produce en ecosistemas acuáticos (Falkowsky *et al.* 1998), siendo el fitoplancton oceánico el responsable de gran parte de la producción primaria neta global (Valiela, 1995; Behrenfeld *et al.* 2001). La fotosíntesis es la base de la mayor parte de la biomasa y

biodiversidad del planeta, por lo que cualquier factor que altere el crecimiento o la actividad fotosintética de estos microorganismos, influirá también sobre estos dos factores.

Muchas especies fitoplanctónicas producen toxinas que tienen impacto directo sobre otros invertebrados y vertebrados. Cianobacterias, diatomeas, crysophytas y dinoflagelados pueden sintetizar compuestos que afectan a organismos que ingieren el citoplasma celular, o bien al colapsar, liberar sus toxinas al medio. Estas toxinas pueden encontrarse en todos los niveles tróficos, gracias a los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación.

Las marismas, humedales, estuarios y bahías están entre los sistemas más productivos del planeta, y proporcionan un hábitat esencial a muchas especies acuáticas y terrestres (McLusky and Elliot, 2004). Gran parte de su productividad y biodiversidad está relacionada con la producción y composición del fitoplancton. Las variaciones temporales en la composición del fitoplancton, o su sucesión en estos sistemas marinos están relacionadas con la compleja interrelación entre muchos factores que pueden incluir temperatura y estratificación del agua, presencia de nutrientes inorgánicos, disponibilidad de luz, presión alimentaria del zooplancton y alelopatía (Barbosa *et al.* 2010; Pulina *et al.* 2012; Calic *et al.* 2013). Así, factores que actúan en la base de las redes tróficas pueden influenciar la forma y funcionamiento del ecosistema entero.

3.2. AFLORAMIENTOS DE MICROALGAS: UN PROBLEMA CON MÚLTIPLES CAUSAS Y CONSECUENCIAS.

Los afloramientos (*blooms*) de microalgas son eventos de multiplicación y acumulación de organismos planctónicos en un corto periodo de tiempo (horas a días). Son fenómenos naturales que ocurren ante determinadas condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de unas especies más que otras. Existe una gran diversidad taxonómica en las especies de fitoplancton capaces de formar afloramientos, que comprenden desde protistas de las clases Bacillariophyceae (diatomeas), Chlorophyceae (algas verdes) o Dinophyceae (dinoflagelados), hasta bacterias de la

clase Cyanophyceae (cianobacterias). Pueden ocasionar diferentes tipos de alteraciones sobre el ecosistema y sus componentes: Afloramientos, incluso de especies no productoras de toxinas, agotan el oxígeno disuelto del agua y pueden irritar las branquias de los peces, mientras que las especies tóxicas se acumulan rápidamente en el agua y suponen una amenaza para los mismos peces, las aves y también para el ser humano. Los afloramientos pueden afectar a las personas por tres vías: Consumo de pescado o marisco contaminado, ingestión de agua con toxinas (por ejemplo durante el baño en aguas de recreo) o inhalación de aerosoles (CDC 2012).



FIGURA 3.2 (A) AFLORAMIENTO DE CIANOBACTERIAS

El importante incremento en la frecuencia de aparición y duración de estos fenómenos a escala mundial está asociado al incremento de la eutrofización de los cuerpos de agua (Paerl, 1996). Las aguas con alto contenido de nutrientes (eutrofizadas) u otros residuos químicos (contaminadas) alteran la composición y estructura del componente de microorganismos fotosintéticos del plancton. Una de las respuestas inmediatas y evidentes es la disminución de la diversidad de las comunidades, favoreciendo el incremento de las pocas especies más aptas para crecer en estas condiciones especiales. Este proceso puede producirse de forma natural e irreversible; pero lo más frecuente es que su origen sea antropogénico, por descargas de aguas residuales, o bien por el lixiviado de fertilizantes procedentes de explotaciones agrícolas. En este

caso, la tasa de renovación es mucho más rápida, y el proceso puede llegar a ser reversible si se eliminan las condiciones que lo propiciaron.

Las cianobacterias están presentes en ecosistemas de agua dulce, salada y terrestres, donde actúan como productores primarios. Constituyen aproximadamente 150 géneros que engloban a 2000 especies. La mayoría presentan un metabolismo fotoautotrófico y aeróbico. Su ciclo vital sólo requiere agua, CO₂, sustancias inorgánicas y luz, lo que les permite crecer en medios muy simples. Las especies capaces de fijar el nitrógeno atmosférico contribuyen a la fertilización del suelo y agua (Rai, 1990). Otras son importantes desde el punto de vista económico, al ser fuentes de compuestos de interés como carotenoides y antibióticos (Falch *et al.*, 1995). Finalmente, algunas especies se utilizan en alimentación por su alto contenido en proteínas, vitaminas y otros factores de crecimiento, como es el caso de *Spirulina*, teniendo incluso una función hepatoprotectora (Madrigal-Santillán *et al.* 2014).

Los afloramientos de cianobacterias se producen en aguas con elevado contenido en nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), con alta intensidad de luz, baja velocidad del viento y temperaturas medias por encima de los 16,7°C (Zhang *et al.* 2012), lo que permite que en climas templados se den con mayor frecuencia a finales de primavera, verano y principios del otoño. Pero además de estos factores, las cianobacterias poseen gran capacidad para obtener nitrógeno y fósforo del medio. Algunas especies pueden utilizar el nitrógeno gaseoso disuelto en el agua (e incluso actúan como fijadores de nitrógeno para las plantas) y también muestran una gran capacidad de almacenamiento de fósforo, que es el elemento limitante de la producción en sistemas acuático continentales. En algunos casos el P almacenado les permite llevar a cabo de 2 a 4 divisiones celulares (Scheurs, 1992) lo que las hace muy competitivas en estos ambientes.



FIGURA 3.2 (B) “MAREA ROJA” O AFLORAMIENTO DE DINOFLAGELADOS (ALEXANDRIUM MINUTUM)

Cuando el episodio se produce principalmente por algunas especies de dinoflagelados, que le dan un color rojo o pardo, puede denominarse marea roja (*red tide*). Estas mareas se producen naturalmente, pero el agua de arrastre rica en nutrientes procedente de la agricultura, el transporte de especies productoras de toxinas ligadas a los barcos y las explotaciones de acuicultura costera (que son una fuente de nutrientes y a la vez objetivos potenciales de la toxicidad ambiental) pueden provocar o facilitar su aparición. Ocasionan importantes efectos económicos, ecológicos y de salud pública en ecosistemas costeros y de estuario (Anderson *et al.* 2012). Sus consecuencias pueden variar en función de la adaptación de los ecosistemas marinos a los cambios climáticos, y la predicción de su alcance requiere una mejor comprensión de la respuesta de los organismos a cambios medioambientales a pequeña escala (Hallegraeff 2010).

Las mareas rojas contaminan los recursos pesqueros, especialmente en el caso de filtradores (bivalvos), y se necesita controlar frecuentemente sus parámetros para asegurar la seguridad alimentaria de los consumidores. La distribución de los quistes, la circulación costera y las entradas de agua dulce (especialmente en el caso de los estuarios) afectan directamente a la evolución de la marea roja (Anderson *et al.* 2005). Por su propia definición de explosión demográfica, todos los factores que afecten a pequeña escala en el crecimiento celular (temperatura del agua, salinidad,

concentración de nutrientes o predación por parte del zooplancton) afectarán también a gran escala a la evolución del afloramiento.

Tanto diatomeas de los géneros *Nitzschia* y *Pseudonitzschia* como los dinoflagelados *Prorocentrum lima* y *Alexandrium minutum* son organismos que forman afloramientos frecuentes en ecosistemas costeros y de estuario, especialmente en aquellos donde hay una importante entrada de agua salada por las mareas (como sucede en Doñana). Sus consecuencias dependerán en gran medida de otros factores bióticos y abióticos presentes en el sistema, por lo que es necesario estudiar en profundidad sus interacciones con el resto de los elementos.

3.3. PRODUCCIÓN DE TOXINAS

El ácido domoico (AD), un aminoácido producido por diatomeas bentónicas de los géneros *Nitzschia* y *Pseudonitzschia*, es un agonista del receptor glutamato en forma de análogo rígido del aminoácido excitatorio glutamato. (Tiedeken *et al.* 2005) Estudiando el posible rol de bacterias asociadas a *Pseudonitzschia* en la producción de A. domoico no se demostró que fueran responsables, pero sí que podían proveer de precursores para su síntesis (Bates *et al.* 2004). La ingestión de moluscos contaminados con ácido domoico produce en personas una intoxicación conocida como intoxicación amnésica por bivalvos (*amnesic shellfish poisoning*, ASP).

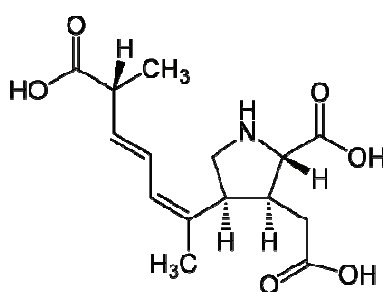


FIGURA 3.3 (A) ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ÁCIDO DOMOICO

El ácido okadaico (AO) es un polietér con efecto neurotóxico, que inhibe PP1 y PP2A (Tanti *et al.* 1991; Valdiglesias *et al.* 2013). Al ser ingerido por el ser humano, provoca intoxicación diarreica por bivalvos (*diarrhetic shellfish poisoning*, DSP).

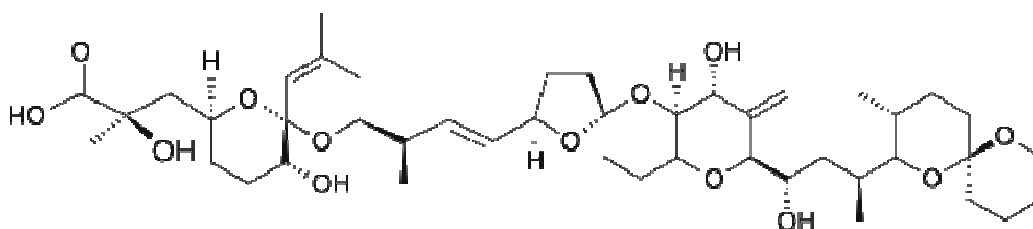


FIGURA 3.3 (B) ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ÁCIDO OKADAICO

Las saxitoxinas (STX) son un grupo de alcaloides neurotóxicos producidos por dinoflagelados y cianobacterias de agua dulce. Incluyen saxitoxina pura (STX), neosaxitoxina (neo STX), gonyacitoxinas (GTX) y decarbamoylsaxitoxina (dcSTX). Actúan en los canales de sodio voltaje-dependientes de las células nerviosas, impidiendo su función y causando parálisis (Boczar *et al.* 1988; Cusick and Sayler, 2013). Su ingestión provoca intoxicación paralizante por bivalvos (*paralysis shellfish poisoning* PSP).

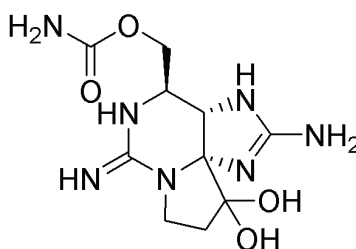


FIGURA 3.3 (C) ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA SAXITOXINA

Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos producidos por cianobacterias del género *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktothrix* y *Oscillatoria*. Contienen tanto aminoácidos proteicos como no proteicos. La fórmula general de estos péptidos es ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-DGlu-Mdha). Existen más de 70 variantes de microcistinas por modificaciones estructurales como es la variación de los L-aminoácidos X e Y. Además hay isoformas generadas por metilación, hidroxilación, y epimerización (Neilan *et al.* 1999; Bittencourt-Oliveira *et al.* 2014). Una misma cepa puede producir más de una variante de microcistina al mismo tiempo. El α -aminoácido Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2, 6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico) es común a

todas las microcistinas, y también está presente en las nodularinas. Se considera el principal responsable de la toxicidad de estos péptidos.

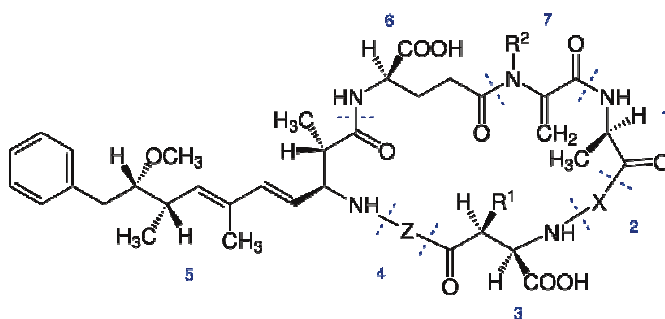


FIGURA 3.3 (D) ESTRUCTURA MOLECULAR GENERAL DE LAS MICROCISTINAS

Las microcistinas son potentes inhibidores de las seríntreoninfosfatasa 1 y 2^a (PP1 y PP2A) (MacKintosh *et al.* 1990) implicadas en muchos procesos celulares como la mitosis, la síntesis de proteínas, la señalización celular, el transporte de calcio, la contracción muscular, etc. (Wera *et al.* 1995). Afectan principalmente a los hepatocitos, provocando deformación hepática con colapso de la arquitectura del hígado, hemorragia intrahepática y necrosis (Ito *et al.* 1997; Vortoli and Volmer, 2014).

3.4. *Artemia franciscana*, MODELO DE ZOOPLANKTON.

El género *Artemia* (Phylum Artropoda, Subphylum Crustacea, Clase Branchiopoda, Superorden Sarsostraca, Orden Anostraca, Familia Artemiidae) tiene gran importancia económica en la industria de la acuicultura (Agh *et al.* 2008). Con una amplia distribución por todo el mundo, y más de 500 citas documentadas (Maniatsi *et al.* 2009) es uno de los organismos más estudiados, y su presencia es conocida desde hace tiempo por la humanidad. Aunque la mayoría de artículos científicos atribuyen la primera cita a Schlösser en 1755 (Limnington), hay evidencias de que ya era consumida como alimento por algunas tribus de nativos americanos, e incluso una cita en un texto persa del año 982 de un “gusano” que vive en una laguna salada, que ha sido relacionado también con este género (Asem, 2008).

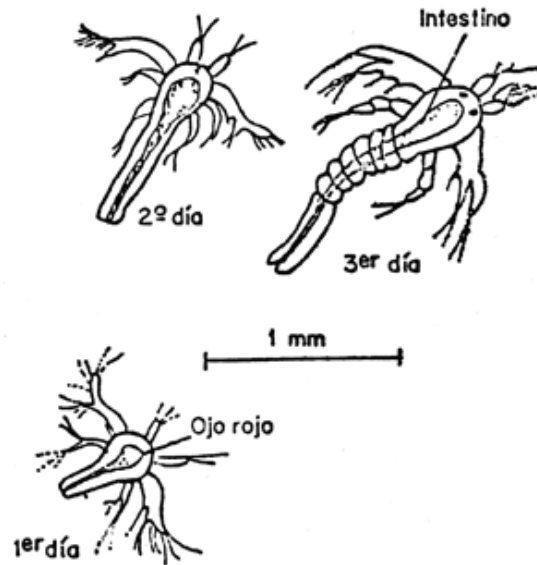


FIGURA 3.4 (A) ESQUEMA DE LOS CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LAS LARVAS DE ARTEMIA DURANTE LAS PRIMERAS 72 HORAS POST ECLOSIÓN.

Dentro del género *Artemia* se reconocen seis especies sexuales dioicas, y un gran número de poblaciones partenogenéticas, con características comunes tales como adaptabilidad a amplios rangos de salinidad (5-250 g/L) y temperatura (6-35 °C), ciclo vital corto, gran adaptación a cambios ambientales, alta fecundidad, alternancia de reproducción partenogenética y sexual, cuerpo de pequeño tamaño y adaptabilidad a varias fuentes de nutrientes, por su mecanismo de alimentación mediante filtrado no selectivo (Nunes *et al.* 2006).

Es un organismo que se adapta muy bien a condiciones ambientales hipersalinas, dónde sobrevive y se reproduce con normalidad. Esta adaptación se produce gracias a mecanismos a varios niveles, tanto individual (molecular, celular, fisiológico) como de población. El más importante es un eficiente sistema de osmoregulación, que le permite resistir hasta diez veces la concentración de sal media del agua marina (Gajardo and Beardmore, 2012). En condiciones ambientales extremadamente adversas, como por ejemplo la desecación de lagos estacionales pero también bajas concentraciones de oxígeno, falta de comida, salinidad por encima o por debajo de su amplio margen de tolerancia, las artemias resisten formando una gástrula embrionaria encapsulada altamente resistente, denominada quiste, capaz de deshidratarse por completo y mantenerse en diapausa hasta que las condiciones ambientales vuelvan a

ser favorables. Esta adaptación fisiológica, gobernada por 324 genes codificadores de proteínas para la diapausa y su recuperación posterior (Chen, 2009), es posible gracias a la capacidad desarrollada por las hembras para “percibir” la aproximación de cambios medioambientales desfavorables y cambiar su modo de reproducción de ovovivíparo (producción de nauplios libres que expanden rápidamente la población en condiciones adecuadas) a ovíparo (producción de quistes que actúan como bancos de genes en condiciones adversas). Clegg y Trotmann (2002) consideran a estos quistes “el estado más resistente al estrés ambiental de toda la historia de la vida animal” y a las fases móviles (nauplios y adultos) “los osmoreguladores más eficientes de todo el reino animal”.

Las características intrínsecas de este género le hacen adecuado para su uso en toxicología ambiental, garantizando la fiabilidad, la viabilidad y la relación coste-eficiencia de los ensayos. Persoone y Wells en principio (1987) presentaron algunas objeciones a su uso como modelo, como la ausencia de *Artemia* de la mayoría de ecosistemas marinos, la presupuesta falta de sensibilidad a muchas sustancias químicas basada en su resistencia innata a las condiciones de salinidad extrema, y al fracaso de algunos estudios que utilizaban este organismo, pero sin embargo ellos mismos desarrollaron el modelo que se utiliza hoy en día en ecotoxicología (condiciones del ensayo, especies, etc) comprobando que en la práctica estas condiciones desfavorables no se cumplían. Son mayoría las características que apuntan a su idoneidad, como su amplia distribución geográfica en zonas costeras, su relativamente fácil cultivo y mantenimiento en el laboratorio, su resistencia a la manipulación, su ciclo de vida corto, su gran fecundidad y la gran cantidad de información disponible sobre alguna de sus especies (Nunes, 2006) Además, su pequeño tamaño permite una reducción en el volumen de los test, menor producción de residuos, y espacio necesario para su mantenimiento (Blaise, 1998).

En los últimos años se han realizado muchos intentos para estandarizar la utilización de organismos representativos en ensayos multiespecíficos y que engloben a diferentes niveles tróficos. Un procedimiento estandarizado implica el cultivo de los animales y el mantenimiento de los factores abióticos ambientales para garantizar la

reproductibilidad de los resultados. La elección de un adecuado modelo animal comprende aspectos como la biología, ciclo de vida, adaptación a las condiciones de laboratorio, relevancia ecológica, uso sistemático y cuestiones prácticas de mantenimiento de sus cultivos.

Artemia responde favorablemente a muchas de estas cuestiones, permitiendo el desarrollo de ensayos que la utilicen como modelo; si bien es necesario estudiar en profundidad las diferencias en función de la especie y sobre todo el origen geográfico de la cepa, por lo que para mejorar la reproductibilidad de los resultados es importante garantizar que los quistes proceden del mismo origen.



FIGURA 3.4 (B) NAUPLIO Y METANAUPLIO DE ARTEMIA

En cuanto a la elección del criterio de valoración (*endpoint*) en los ensayos, es común utilizar la mortalidad de nauplios recién eclosionados (24 horas), aunque existen diferentes estudios que han testado la fiabilidad de otros estadíos. Por ejemplo, Barahona y Sánchez-Fortún (1996) mencionan un punto crítico a las 48 horas post-eclosion que se traduce en una mayor sensibilidad relativa a la mayoría de los compuestos estudiados. También otros estudios miden la viabilidad (porcentaje de eclosión) de quistes expuestos (Carballo *et al.* 2002) encontrando concordancia en los resultados, por lo que los dos criterios (porcentaje de eclosión y mortalidad de nauplios) pueden ser utilizados de forma complementaria. En el presente trabajo, la exposición al tóxico del modelo se produce en gran medida por ingestión de las células portadoras de toxinas durante la alimentación, por lo que no tiene sentido el ensayo de exposición de fases inertes que aún no se alimentan.

Otro factor a considerar es la importancia de *Artemia* como vector potencial de bioacumulación de contaminantes ambientales a causa de su posición en las redes tróficas como consumidor primario. En un estudio sobre chlorpirifos (un pesticida empleado en procedimientos agrícolas) se encontró a *Artemia* responsable del fenómeno de biomagnificación que produjo valores más elevados de lo esperado en dos especies de peces (*Gambusia affinis* y *Aphanius Iberus*) que se alimentaron de ellas (Varó *et al.* 2000). Sin embargo, otro estudio sobre metales pesados (Petrucci *et al.* 1995) no observó bioacumulación en peces que se alimentaban de *Artemia*. Por este motivo, ya que la bioacumulación está fuertemente influenciada por mecanismos tóxico-específicos es necesario un número mayor de estudios que clarifiquen el rol de este invertebrado como vector de bioacumulación y biomagnificación.

Por último, es importante destacar que ya se han realizado ensayos con *Artemia* para las toxinas estudiadas en los objetivos de este trabajo, como por ejemplo Beattie *et al.* (2003) en cianobacterias, que puso de manifiesto la detoxificación de microcistinas vía conjugación con glutatión s-transferasa (GST) en fases adultas de *Artemia*, o Nipper (2000) que obtuvo una buena respuesta en ensayos de toxicidad aguda para contaminantes presentes en ecosistemas costeros y de estuario.

3.5. LOS ESTUARIOS: UN SISTEMA COMPLEJO Y DINÁMICO.

Cameron y Pritchard (1963) definen un estuario como un cuerpo de agua semicerrado conectado con mar abierto, en donde el agua de mar se halla mezclada con agua dulce procedente del drenaje terrestre. Los estuarios pueden clasificarse en base a su balance de entradas de agua en positivos, inversos y de baja afluencia:

Los estuarios positivos son aquellos dónde las entradas de agua dulce procedentes de la descarga fluvial, precipitaciones y deshielo, exceden a las pérdidas por evaporación o congelación, estableciendo un gradiente longitudinal de densidad que conduce un volumen neto de flujo de agua hacia el océano.

En los estuarios inversos, las pérdidas de agua dulce son mayores que las entradas, de forma que la descarga fluvial no existe (o es muy escasa). Se llaman inversos o

negativos porque su gradiente de densidad es de signo contrario al presente en los positivos (la densidad del agua aumenta hacia la zona alta). Debido a que en estas circunstancias la descarga de agua es mucho más lenta que en los positivos, son zonas más proclives a tener problemas en la calidad del agua.

Los estuarios de baja afluencia aparecen en zonas con tasas de evaporación muy altas y con muy poca descarga fluvial, que en temporadas secas y cálidas alcanzan máximos de salinidad (denominados “tapones salinos”). En la zona alta, la densidad del agua es más baja que en el tapón, como en un estuario positivo, y en la zona baja, la densidad también es más baja que en el tapón, como en un estuario inverso, actuando como una barrera que impide la descarga de agua fluvial y la entrada de agua marina.



FIGURA 3.5 (A) ECOSISTEMA DE ESTUARIO

Atendiendo a la estratificación de la columna de agua, o estructura de salinidad vertical, los estuarios pueden clasificarse en pluma o cuña de intrusión salina, muy estratificados, poco estratificados y mezclados verticalmente (Cameron and Pritchard, 1963). Esta clasificación considera el antagonismo que se establece entre la flotabilidad del agua fluvial (por tener una menor densidad) y la mezcla por efecto de las mareas. Esta última fuerza es proporcional al volumen de agua salada que entra en el estuario en cada ciclo de mareas.

Cuando el río presenta un caudal importante, y la fuerza de la marea es débil se produce una pluma de intrusión salina (como por ejemplo en el Delta del Ebro). Este sistema se mantiene muy estratificado durante la marea alta, y puede volverse menos acusado en temporadas secas.

Ríos de caudal medio a grande combinados con mareas débiles a moderadas producen estuarios muy estratificados. La columna de agua presenta unas características similares a las de cuña marina, pero se mantiene durante todo el ciclo mareal, normalmente en estuarios con profundidad mayor a 20m (fiordos).

En los estuarios poco estratificados o parcialmente mezclados observamos la combinación de mareas moderadas a fuertes con ríos de poco caudal. El perfil medio de salinidad presenta una estratificación continua en toda la columna, excepto cerca del fondo, donde existe mezcla. El flujo de intercambio es más fuerte que en los tipos anteriores por la mezcla de aguas fluviales y oceánicas.

Mareas fuertes y ríos de caudal muy débil propician la mezcla continua de las aguas de ambos orígenes, formando estuarios verticalmente mezclados. En ellos, los perfiles de salinidad son prácticamente homogéneos y debido a su escasa profundidad, los flujos de entrada y salida se establecen a veces horizontalmente en lugar de en la columna vertical, especialmente en temporadas secas y estuarios con una entrada ancha.

Todos estos perfiles pueden cambiar entre un tipo y otro en función del ciclo mareal, del mes, de la estación o de la localización dentro del mismo estuario.

En base a su geomorfología podemos clasificarlos en planicies costeras, fiordos, tectónicos y de barrera. Todas las categorías influirán en la dinámica de mareas que se establezca en ellos.

En sistemas geográficos de este tipo, el régimen de mareas suele ser de tipo cooscilante (impulsada directamente por la marea oceánica, generada por los movimientos astronómicos) pero su amplitud y dirección están determinadas por la forma y batimetría de la costa que contiene a este cuerpo de agua, dándole un periodo

de oscilación propia en función de la longitud y profundidad del canal. Como en cualquier oscilador armónico, cuando la oscilación forzada que proviene de mar abierto tiene un periodo igual al periodo natural de oscilación del cuerpo de agua, se produce el conocido fenómeno de resonancia; bajo este efecto, la amplitud de la onda sufre la máxima amplificación en el interior del dominio (Álvarez *et al.* 2001).

En el caso del estuario del Río Guadalquivir, su caudal de agua dulce medio es de 113 m³/s, que supone velocidades de la corriente medias no superiores a 5 cm/s, y está determinado por el clima mediterráneo, con veranos secos y cálidos e inviernos suaves (Álvarez *et al.* 2001). Sólo en periodos muy concretos, que ocurren con más frecuencia en invierno, se producen apreciables crecidas, con caudales máximos que rara vez alcanzan 350 m³/s, mientras que en la mayor parte del año el caudal de agua dulce es muy pequeño, no superando los 3m³/s. Estas características hacen que normalmente encontremos una estratificación de la columna de agua de tipo mezclado.

Pero a lo largo del curso del Guadalquivir se han realizado diversas actuaciones de origen antropogénico que han modificado su configuración natural: Tanto la presencia de la esclusa de Sevilla 89 km aguas arriba, construida para eliminar el efecto de la marea en el Puerto de Sevilla, como la necesidad existente de que puedan acceder grandes barcos (que demanda la necesidad de aumentar la profundidad del río desde su desembocadura hasta la esclusa en unos 6,5 m), hacen que la delimitación de la zona estuarina del Guadalquivir no se produzca como indica la definición de Cameron y Pritchard en su límite natural del área de actuación de la pluma de intrusión salina (30 Km) sino por la región de propagación de onda de marea, que tiene un límite preciso en la esclusa situada a 89 Km, y que marca el final de la zona alta del estuario. Estas actuaciones han modificado de manera considerable la hidrodinámica del sistema. Por los efectos de resonancia y fricción, y pese a la escasa profundidad presente naturalmente, las ondas provocadas por la marea alta apenas se atenúan a lo largo de toda su extensión y sin embargo episodios de fuertes precipitaciones que aumenten la entrada de agua dulce pueden atenuar o incluso revertir este efecto de forma temporal (Álvarez *et al.* 2001).

Todos estos factores afectan de forma directa a la estructura y diversidad de las especies de fitoplancton presentes, en función de parámetros como la tolerancia a la salinidad, transporte longitudinal a lo largo del estuario, situación en la columna de agua o alimentación por parte del zooplancton, modificando las consecuencias ecológicas, económicas y sociales de los afloramientos de cianobacterias procedentes de la descarga fluvial, y de las mareas rojas de dinoflagelados que alcancen el sistema desde el océano. Creemos que un enfoque toxicológico puede ayudar a comprender mejor la evolución de estos episodios, predecir su aparición y prevenir sus consecuencias, teniendo en cuenta los parámetros (físicos, químicos y biológicos) que afectan a su ecología.

4. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

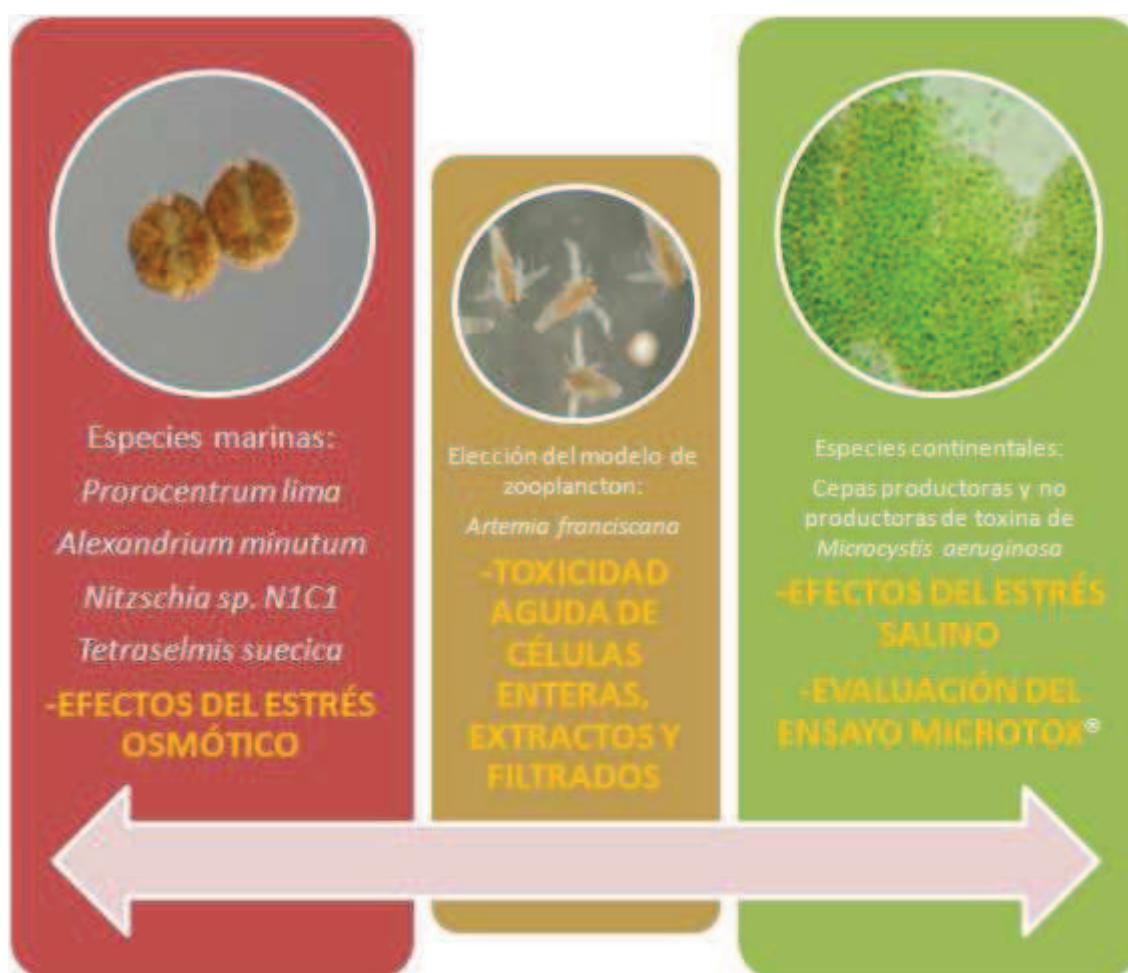


FIGURA 4 (A) ESQUEMA DE LOS BLOQUES DE OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar las interacciones producidas en ambientes de estuario entre especies polifiléticas del fitoplancton tanto marino como continental al enfrentarse a cambios de salinidad provocados por el flujo de mareas y la entrada de agua dulce, haciendo especial hincapié en especies productoras de toxinas que pudieran afectar al zooplancton, como vía de entrada en las cadenas tróficas.

Para ello, se concreta en dos objetivos específicos para tratar fitoplancton marino (que entra al estuario por flujos mareales) y fitoplancton continental (que entra por arrastre de aguas dulces). A su vez, para cada uno de estos objetivos específicos, se estudia en primer lugar el impacto de los cambios de salinidad sobre diversos parámetros

fisiológicos de los microorganismos (crecimiento, balance de oxígeno fotosíntesis/respiración, y fotosistema II) y posteriormente los efectos de la ingestión de dichos microorganismos por larvas de *Artemia franciscana*, utilizado como modelo de zooplancton.

Por último, se estudia la utilidad del sistema comercial Microtox® como alerta temprana del riesgo toxicológico en afloramientos de cianobacterias en dichos ecosistemas, comparándolo con métodos de enzimoimmunoanálisis que detectan sus toxinas.

5. ARTÍCULOS PUBLICADOS

5.1. TOXIC EFFECTS INDUCED BY SALT STRESS ON SELECTED FRESHWATER PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC MICROALGAL SPECIES.

Toxic effects induced by salt stress on selected freshwater prokaryotic and eukaryotic microalgal species

M. C. Bartolomé · A. D'ors · S. Sánchez-Fortún

Accepted: 29 September 2008 / Published online: 15 October 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract In order to determine the short-term impact induced by salt stress, cultures of *Dictyosphaerium chlorelloides* and *Microcystis aeruginosa* were grown in presence of increasing sea-salt concentrations. Growth rate and photosystem II activity in *D. chlorelloides*, and photosynthetic oxygen production (in both species) were analyzed. A concentration-dependent response was obtained with the presence of sea-salt in culture medium, being *M. aeruginosa* ($EC_{50(72)} = 76.6$ mM) more sensitive to salt stress than *D. chlorelloides* ($EC_{50(72)} = 340.7$ mM). However, comparative analysis between growth and Φ_{PSII} inhibition in *D. chlorelloides* shown that there are not significant differences among $EC_{50(72)}$ values obtained. An immediate toxic response, induced by increase of sea-salt concentration, has been obtained applying the calculated $EC_{50(72)}$ values in both species. These results shown that sea-salt acts as a sensitive and rapid toxic compound in algal cells, and that the sensitivity of *M. aeruginosa* to salinity stress is much higher than that of *D. chlorelloides*.

Keywords Toxicity · Salt stress · *Dictyosphaerium chlorelloides* · *Microcystis aeruginosa* · Growth rate · Photosynthetic activity

Introduction

Saltwater intrusion is the introduction, accumulation, or formation of saline water into a water of lesser salinity. The processes involved can be natural or human-induced but are particularly exacerbated by human activity such as urbanization, dredging and other various modifications in the hydrology of tidal streams. The result of this is the ultimate loss of tidal marshes and associated wildlife, contamination of freshwater resources, and degradation of the immediate shoreline.

High-salt stress is a major environmental factor that limits plant growth and productivity (Boyer 1982). The detrimental effects of high concentrations of salt on plants can be observed at the whole-plant level as the death of plants and/or decreases in productivity. Reductions in plant growth due to salt stress are often associated with decreases in photosynthetic activities, such as the electron transport (Greenway and Munns 1980). Effects of salt stress have been examined in various salt-sensitive and tolerant plants, including some crop (Cheeseman 1988) and a facultative halophyte (Adams et al. 1992), as well as in cultured cells (Sumaryati et al. 1992), but mechanisms of inhibition of photosynthesis by salt stress remain poorly defined.

Chlorophyceans and cyanobacters play an important role in the equilibrium of aquatic ecosystems, being the trophic chain level to produce organic matter and oxygen. The rest of aquatic biota is strictly dependent upon the photosynthetic activity of these organisms. Perturbations of phytoplanktonic populations and alterations of their primary production may have severe repercussions on the other biotic communities. Nowadays eukaryotic and prokaryotic cells are regarded as relevant indicators in the field of environmental monitoring and assessment. Owing to their easiness of culture and sensitivity to a number of

M. C. Bartolomé
Facultad de Quimicofarmacología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Calle Santiago Tapia, no 43, 58000 Morelia, Michoacan, Mexico

A. D'ors · S. Sánchez-Fortún (✉)
Dpto. Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: fortun@vet.ucm.es

**5.2. TOXIC RISK ASSOCIATED WITH SPORADIC OCCURRENCES OF
MICROCYSTIS AERUGINOSA BLOOMS FROM TIDAL RIVERS IN MARINE AND
ESTUARINE ECOSYSTEMS AND ITS IMPACT ON *ARTEMIA FRANCISCANA*
NAUPLII POPULATIONS.**



Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations

A. D'ors^a, M.C. Bartolomé^b, S. Sánchez-Fortún^{a,*}

^a Dpto. Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Facultad de Quimicofarmacología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Calle Santiago Tapia, No. 43, 58000 Morelia (Michoacán), Mexico

HIGHLIGHTS

- *Microcystis* blooms keep their toxicity, even when they are dragged to estuarine.
- *Microcystis aeruginosa* blooms associated with tidal flows can be harmful to *Artemia nauplii*.
- The toxicological impact on nauplii depends of the cyanobacterial strain involved.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2012

Received in revised form 6 November 2012

Accepted 16 November 2012

Available online 14 December 2012

Keywords:

Microcystis aeruginosa strains

Estuaries

Microcystin-LR

Environmental risk

Artemia franciscana

Immunoassay

ABSTRACT

Microcystis aeruginosa is a species of freshwater cyanobacteria which can form harmful algal blooms in freshwater water bodies worldwide. However, in spite its sporadic occurrences for short periods of time in estuarine waters, their influence on zooplankton populations present in these ecosystems has not been extensively studied. In this work, *Artemia franciscana* was used as test organism model, studying mortality against several strains of *M. aeruginosa* with different degrees of toxigenicity, measuring whole-live cells and homogenate extracts. Results were compared with microcystin-LR equivalent content, measured by immunoassay. The results show that there were no significant differences between both exposure models (whole cells and extracts), and there are significant differences respect to the toxigenicity of cyanobacterial blooms depending of the *M. aeruginosa* strain involved in the process. Analysis of microcystin-LR equivalent concentration test immediately below the lowest significant concentration in all *M. aeruginosa* strains was used to determine the potential risk associated with the cell densities during a bloom. Comparison among the selected *M. aeruginosa* strains show that these factors have influence in the results obtained, and thus, several differences have been evidenced depending of the microcystin-LR equivalent production and the strain type involved.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biodiversity is a measure of community structure, whether it is expressed merely as species richness or with a specific index. Different phytoplankton diversity studies demonstrated, according to the dynamic equilibrium model of Huston (1979), that diversity is reduced by competitive exclusion under conditions of high production and low levels of disturbance, or where production is too slow to allow recovery from mortality. Changes in species composition and diversity may produce changes in community level parameters, like zooplankton and those parameters regulating the community phytoplankton growth rate. Furthermore, high-

functioning and competitively dominant species are more likely to be found within species-rich communities (Reiss et al., 2009). It is important to understand how these changes are reflected in ecosystem functioning and ecosystem services (Duarte et al., 2006).

Microcystis aeruginosa is a cyanobacterium species that can form harmful algal blooms in freshwater water bodies worldwide (Chorus, 2005), in both pelagic and benthonic communities (Welker et al., 2007). Its distribution has spread into some estuaries including the Guadiana River in Spain and Portugal (Rocha et al., 2002). Although the potential impact of *Microcystis* blooms on human health is known, its potential impact on the structure and function of aquatic food webs is poorly understood (Ibelings and Havens, 2008).

Cyanobacteria produce a large array of metabolites including organic and amino acids, peptides, alkaloids, carbohydrates, and

* Corresponding author. Tel.: +34 913943841.

E-mail address: fortun@vet.ucm.es (S. Sánchez-Fortún).

**5.3. IMPORTANCE OF STRAIN TYPE TO PREDICT THE TOXICOLOGICAL RISK
ASSOCIATED WITH *MICROCYSTIS AERUGINOSA* BLOOMS: COMPARISON
OF MICROTOX[®] ANALYSIS AND IMMUNOASSAY.**

Journal of Coastal Life Medicine

journal homepage: www.jclmm.com



Document heading

doi:10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0035

© 2014 by the Journal of Coastal Life Medicine. All rights reserved.

Risk associated with toxic blooms of marine phytoplankton functional groups on *Artemia franciscana*Ana D'ors¹, María Carmen Bartolomé², Sebastián Sánchez-Fortún^{1*}¹Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University, s/n Puerta de Hierro Ave., 28040 Madrid, Spain²Faculty of Chemistry-Pharmacobiology, Michoacana de San Nicolás de Hidalgo University, 43 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), Mexico

PEER REVIEW

Peer reviewer

Zengling Ma, Ph.D, Associate Professor, Zhejiang Provincial Key Lab for Subtropical Water Environment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China. Tel: +86-13736756639, E-mail: mazengling@wzu.edu.cn

Co-reviewer: Dr. Amany Abdel Hamid Ismael, Alexandria, Egypt.

Comments

This is a valuable research work in which authors have demonstrated the lethal effect of 3 harmful algae on model organism *A. franciscana*. Furthermore, the report provided readers the antagonistic effects of harmful algae on mortality of *A. nauplii* during both ternary mixture and the binary combinations. It has ecological significance when evaluate the risk of harmful blooms in natural environment.

Details on Page 630

ABSTRACT

Objective: To study mortality of copepod *Artemia franciscana* against the occurrence of harmful marine algae and possible toxicological changes exhibited by binary and tertiary combinations of these harmful algae toxins.

Methods: Twenty four hours acute toxicity assays were performed with selected concentrations of *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima* and *Nitzschia* N1c1 living cells. Additionally, the results were analyzed using the median-effect/combination index (CI)-isobologram equation to assess possible changes in the toxic effect induced by phytoplankton functional groups.

Results: Biotxin equivalent values obtained by immunodetection were (2.12±0.10), (8.60±1.30) and (4.32±1.67) pg/cell for saxitoxin, okadaic acid and domoic acid, respectively. The 24-h LC₅₀ values estimated to saxitoxin and okadaic acid equivalents were 4.06 and 6.27 µg/L, significantly below the value obtained for *Nitzschia* N1c1, which was established at 467.33 µg/L. CI analysis applied on phytoplankton assemblages showed that both ternary mixture as the binary combinations exhibited antagonistic action on toxic effects in *Artemia nauplii*, which were significantly lower than the toxic effect exhibited by each species studied.

Conclusions: These results show that, although these harmful algae represent a serious risk to estuarine zooplankton community, the presence of phytoplankton functional groups within the same bloom can reduce the potential risk compared to the expected risk when each of the phytoplankton groups are evaluated individually.

KEYWORDS

Harmful algae blooms, *Artemia franciscana*, Phytoplankton functional groups, Combination index, Toxicity

1. Introduction

Hypersaline environments are important natural assets of considerable economic, ecological, scientific and natural value. These ecosystems span large areas worldwide, not only in salt production areas (solar salt works, salterns or

salinas) but also in natural lakes and lagoons, and tidal ponds[1]. Hypersaline ecosystems of both marine and continental inputs are essential, integral and dynamic part of the biosphere while the biogeochemical processes occurring in their unique ecosystems have considerable environmental, social and economic values[2].

*Corresponding author: Dr. Sebastián Sánchez-Fortún, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University, s/n Puerta de Hierro Ave., 28040 Madrid, Spain.
Tel: 34913943841

E-mail: fortun@ucm.es

Foundation Project: Supported by Spanish Government (CTM2012-34757) and the Mexican UMSNH University (CIC/11/301).

Article history:

Received 10 Mar 2014

Received in revised form 6 May, 2nd revised form 14 May, 3rd revised form 27 May 2014

Accepted 1 Jun 2014

Available online 20 Jun 2014

5.4. SALINITY CHANGES AND OSMOTIC STRESS IN MARINE PHYTOPLANKTON SPECIES.

Manuscript Number: JEMBE-D-15-00264

Title: Salinity changes and osmotic stress in marine phytoplankton species

Article Type: Full Length Article

Keywords: Marine phytoplankton; Low-salinity stress; Growth; Photosynthesis; Respiration

Corresponding Author: Prof. Sebastián Sánchez-Fortún, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Complutense University

First Author: Ana D'ors, MVD

Order of Authors: Ana D'ors, MVD; M. Carmen Bartolomé, Ph.D.; Sebastián Sánchez-Fortún, Ph.D.

Abstract: The short-term effect of low salinity was studied using laboratory protocols in some coastal phytoplankton species like chlorophyceae *Tetraselmis suecica*, diatom *Nitzschia N1c1* and dinoflagellates *Alexandrium minutum* and *Prorocentrum lima*. All of cultures were exposed to low salinity rates, and cell growth rate, photosynthetic quantum yield (Φ PSII), and gross photosynthesis (Pg) were analyzed. Growth rate inhibition was similar in all species, and all of them tolerate also short-term exposures to salinities in the range 5-35 PSU. There were no significant differences between Φ PSII and Pg endpoints from *T. suecica* and *Nitzschia* sp., while *A. minutum* and *P. lima* displayed higher affectation rate on Pg than on Φ PSII activity. The influence of low salinity was higher on respiration in *T. suecica*, while in both dinoflagellates were higher in net photosynthesis. *Nitzschia* sp. exhibited similarly involvement of the two photosynthetic parameters. Therefore, although the four phytoplankton monocultures studied are able to survive in internal areas of estuaries under low salinity conditions, the photosynthetic activity is more affected than the growth rate in all phytoplankton communities studied except in chlorophyceae *T. suecica*, which tolerate better this salinity drops.

Highlights

Marine phytoplankton tolerates short-term exposures to salinities in the range 5-35 PSU

Short-term low salinity does not stop the survival upstream of toxic marine microalgae

Low salinity equally alters photosynthesis and cell growth in *Tetraselmis suecica*

Harmful algae exposed to low salinity show different P_g and Φ_{PSII} activity response

In low salinity conditions, O_2 production-consumption ratio varies depending to specie

Salinity changes and osmotic stress in marine phytoplankton species

D'ors, A.¹; Bartolomé, M.C.²; Sánchez-Fortún, S.^{1*}

¹: Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine,
Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

²: School of Chemistry-Pharmacobiology, Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
University, 43 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), Mexico.

*: Corresponding author:

Dr. Sebastián Sánchez-Fortún

Dpto. Toxicología y Farmacología, Fac. Veterinaria, U.C.M. 28040 Madrid, Spain

Tlf: +34913943841

E-mail: fortun@ucm.es

ABSTRACT

The short-term effect of low salinity was studied using laboratory protocols in some coastal phytoplankton species like chlorophyceae *Tetraselmis suecica*, diatom *Nitzschia N1c1* and dinoflagellates *Alexandrium minutum* and *Prorocentrum lima*. All of cultures were exposed to low salinity rates, and cell growth rate, photosynthetic quantum yield (Φ_{PSII}), and gross photosynthesis (P_g) were analyzed. Growth rate inhibition was similar in all species, and all of them tolerate also short-term exposures to salinities in the range 5-35 PSU. There were no significant differences between Φ_{PSII} and P_g endpoints from *T. suecica* and *Nitzschia* sp., while *A. minutum* and *P. lima* displayed higher affectation rate on P_g than on Φ_{PSII} activity. The influence of low salinity was higher on respiration in *T. suecica*, while in both dinoflagellates were higher in net photosynthesis. *Nitzschia* sp. exhibited similarly involvement of the two photosynthetic parameters. Therefore, although the four phytoplankton monocultures studied are able to survive in internal areas of estuaries under low salinity conditions, the photosynthetic activity is more affected than the growth rate in all phytoplankton communities studied except in chlorophyceae *T. suecica*, which tolerate better this salinity drops.

Key words: Marine phytoplankton; Low-salinity stress; Growth; Photosynthesis; Respiration.

1. Introduction

Osmotic stress is one of the most significant abiotic cellular stresses and affects every aspect of plant physiology and metabolism. The physiological and biochemical responses are extensively studied to understand how algae respond and adapt to salinity changes (Kirst 1990).

In estuaries, the tides cycle usually extends inland the influence of salinity. As a result, the upper reaches of estuaries are freshwater systems characterized by the presence of a tidal regime, the freshwater tidal reaches (Muylaert et al. 2005). While several detailed phytoplankton studies have been carried out in the brackish reaches of some rivers (Soetaert et al. 1993; Van Spaendonk et al. 1993; Kromkamp and Peene 1995), there are only a few information of to marine phytoplankton physiological responses in the freshwater tidal reaches, with comparison among growth, photosynthesis and respiration.

In the particular case of estuaries, the continuous river-sea transition and the tidal influence are considered the main determining features of the phytoplankton biomass distribution (Calliari et al. 2005; Domingues et al. 2005; Hagy III et al. 2005). Although, local physic-chemical and biological factors such as water column depth, light availability, nutrient turnover, grazing pressure and species-specific interactions could eventually mask the effect of the longitudinal hydrological gradient (Lucas et al. 1999; Kocum et al. 2002).

The estuarine circulation is a common phenomenon in all estuaries (Day et al. 1989). This circulation has been shown to be responsible for the transport of phytoplankton (Tyler and Seliger 1978; Malone et al. 1980) from coastal waters into estuaries. Thus, the upper reaches of estuaries are often characterized by massive

72 phytoplankton blooms (Moon and Dunstan 1990; Cole et al. 1992; Kies 1997; Muylaert
73 et al. 2005).

74 The development of models aimed at predicting bloom development and toxicity,
75 which will aid coastal resource managers in their efforts to mitigate the wide ranging
76 effects of harmful algal blooms, is currently a global research emphasis. However, the
77 available field data indicate that bloom toxicity for various harmful algal species can
78 vary considerably depending on the physiological status of the algal cells (Anderson et
79 al. 1990; Poulton et al. 2005) and thereby influence the severity of a bloom event.
80 Multiple physic-chemical factors (e.g. temperature, salinity, nutrients) have been
81 reported to change the production of most algal toxins in both laboratory and field
82 populations (Granéli and Turner 2006). In order to predict better bloom toxicity, it is
83 essential to understand how and what these variables modulate biosynthesis and
84 intracellular accumulation of these toxins.

85 Blooms of toxic phytoplankton have been always associated with the estuarine
86 coastal regions (Larocque and Cembella 1990; Lim and Ogata 2005). Giacobbe et al.
87 (1996) showed that the spring blooms of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* in
88 Mediterranean Sea coincided with the increase in rainfall and freshwater runoff that
89 increased the stratification of the water column. Similar findings were obtained in
90 studies with diatoms (Doucette et al. 2008) or *Prorocentrum* spp (Morton et al. 1992)
91 blooms under conditions of low salinity.

92 These data seem to establish a relationship between salinity levels in the aquatic
93 environment and the potential risk from toxic phytoplankton blooms and, interestingly,
94 all these species were found in or close to estuarine regions. *Alexandrium minutum* was
95 found in estuarine semi-enclosed lagoon where blooms of this species caused one
96 casualty and six persons were hospitalized (Lim et al. 2002); *Prorocentrum lima* blooms

generally occur in zones affected by freshwater inputs (large deltas, estuaries, fjords, lagoons) and/or anthropogenic inputs (Grzebyk and Berland 1996); and Thessen et al. (2005) reported an abundance of diatoms in coastal areas where salinity varied widely.

The goal of this study was to experimentally test the hypotheses that the physiology of some common phytoplankton species is significantly influenced by tidal salinity changes, and if there are differences between toxic and non-toxic species. Experiments were conducted to test the inhibitory effects of low salinity on growth rate, photosynthesis and respiration.

2. Methods

2.1. Cultures

The marine microalga *Tetraselmis* spp is a convenient model for physiological and biochemical studies of the mechanisms of the adaptation to salinity (Strizh et al. 2004), and for the maintenance of cellular ion homeostasis in particular when they are exposed to decreasing salinity concentrations. Therefore this specie was included in this study together with the three other toxic algae. Furthermore, *Tetraselmis* spp grows naturally in estuaries, and high tolerance to low salinity is expected. Because diatoms are the major group of photoautotrophic organisms inhabiting intertidal fine sediments in estuaries (Underwood et al. 1998), we have included the strain *Nitzschia* sp. N1c1 as a benthonic phytoplankton representative of them. Finally, we have included two representative harmful bloom-forming species, *Prorocentrum lima* and *Alexandrium minutum*, involved in diarrhetic (DSP) and paralytic (PSP) shellfish poisons, respectively.

Strains of chlorophyceae, *Tetraselmis suecica*, (non-toxic) diatom, *Nitzschia* N1c1 (toxic), and dinoflagellates *Alexandrium minutum* and *Prorocentrum lima* (toxic) were obtained from algal culture collection of Genetics, Faculty of Veterinary, Complutense University, Madrid, Spain. Cells were axenically grown in cell-culture flasks with 20 mL of artificial seawater (30 PSU) enriched with F-2 medium (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), at 20 °C and a photon irradiance of $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400-700 nm, in a 16:8 h light-dark photoperiod. Cells were maintained in mid-log exponential growth by serial cell transfers to fresh medium. Prior to the experiments, the culture cells were recloned (by isolating a single cell) to assure genetic homogeneity in all the cultures.

Inoculations were taken from precultures set up three days before the experiment and cultured/grown under the same conditions.

2.2. Toxicity tests

Sea salt (free from nitrate, phosphate and silicate) was purchased from SERA[®] (Heinsberg, Germany). It was dissolved in distilled water. Because SERA[®] sea salt consists of many different compounds that are present at a wide range of concentrations, the results presented in this work will be expressed as practical salinity units (PSU), in order to simplify the presentation of our data.

Toxicity test were performed to determine the inhibitory effects of low salinity on algal growth, protosynthetic quantum yield and light-dark balance of oxygen at different salinities. The tests were performed in sterile 5 mL polystyrene culture tubes (Sarstedt Co., Nümbrecht, Germany) filled with F-2 medium. Previous studies determined the suitability for using polystyrene culture tubes in toxicity assays, assuring that chemicals and cells do not adhere to the wall tubes (Costas et al. 2001; García-Villada et al. 2002).

The water used for media preparation was of ultrapure quality, distilled by means of Milli-Q device (Millipore, Bedford, MA, USA) and sea salt was added to culture medium. Four sea salt concentrations (10, 15 20, and 25 PSU), as well as four controls (30 PSU), were established and tested. In addition, as an internal quality control for test the cultures, the bioassays were also performed on the reference chemical potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), and each assay was repeated eight times ($n=8$). Both control and test tubes were inoculated with 10^4 cells mL^{-1} as initial concentration.

All the cultures (control and treatments) were incubated for 72 h at 20 °C in a thermostatically controlled chamber (Velp Scientifica, Usmate, Italy) at $60 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ to ensure exponential algal growth. Every 24 h the algal density was quantified under the light microscope with a Neubauer's chamber.

The concentration causing 50% growth inhibition of algae was determined by using light microscope and Neubauer's chamber (Brand, Wertheim, Germany). The quantity causing 50% inhibition of photosynthetic quantum yield (Φ_{PSII}) was obtained by means of the dual-channel PAM chlorophyll fluorometer (ToxY-PAM, Heinz Walz GmbH, Germany). The ToxY-PAM dual-channel yield analyser obtains highly sensitive measurements of effective quantum yield of the algae pigment system II centres via assessment of the chlorophyll fluorescence yield and the saturation pulse method (Schreiber et al, 2002). The light-dark oxygen balance was analysed using a Clark-type O_2 electrode. Dissolved O_2 was measured in a 1 mL reaction chamber from a Chlorolab 2 System (Hansatech, Norfolk, UK). Chlorolab 2. This system allows the study of respiration and photosynthesis from liquid samples, under automated illumination from red (660 nm) LED light and darkness. In the toxicity assays, measurements were taken at 20 °C and $975 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ irradiance. Light-dark oxygen balance, or gross photosynthesis rate (P_g) was estimated from the formula:

171 $P_g = P_n + R$

172 where P_g corresponds to the oxygen production rate in light conditions, R (respiration)
173 corresponds to the process by which microalgal cells consume oxygen and releases
174 carbon dioxide in darkness conditions, and P_n (net photosynthesis rate) is defined as the
175 difference between P_g and R .

176 These parameters (growth rate, Φ_{PSII} activity and P_g) were used as toxic endpoints
177 and expressed as 72-h median inhibition concentration [$IC_{50(72)}$] percentages.

178
179 *2.3. Data analysis*

180
181 The 72-h inhibitory concentrations of salinity on growth rate, protosynthetic
182 quantum yield and gross protosynthesis were expressed as 72h IC_{50} values. These
183 values were calculated according to the *area under the curve* method prescribed by the
184 ISO (ISO 8692 1982). IC_{50} -values were determined by nonlinear regression analysis,
185 and all the results are presented as mean \pm sd.

186 The Φ_{PSII} activity was monitored on the software package ToxyWin v1.14
187 (Heinz Walz GmbH, Germany), and the results are presented as mean \pm sd of inhibition
188 percentage with regard to control. Oxygen measurements obtained both in darkness and
189 in light conditions, were exported to a computerized chart recorder (Oxigraph v1.01,
190 Hansatech, Norfolk, UK).

191 Statistical analysis was performed using the computer software package
192 GraphPad Prism v5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). The experimental data was
193 analysed by one way analysis of variance (ANOVA) and the differences were
194 considered significant at $p < 0.05$.

195

3. Results

The $IC_{50(72)}$ values of growth rate, protosynthetic quantum yield and gross protosynthesis corresponding to the different phytoplankton species used in this study are summarized in Table 1. Analysis of these data shown that there are significant differences interspecies depending of the parameter analyzed. Thus, when growth rate is analyzed, there were no statistically significant differences between them, obtaining median values of 6.63, 5.57, 8.47 and 10.67 PSU from *T. suecica*, *Nitzschia* N1c1, *A. minutum* and *P. lima*, respectively. However, the $IC_{50(72)}$ values of Φ_{PSII} activity were found to be significantly different between the dinoflagellate *P. lima* (14.69 PSU) and the other 3 species, *T. suecica* (7.23 PSU), *Nitzschia* N1c1 (9.28 PSU) and *A. minutum* (9.70 PSU). Significant differences were also found between the $IC_{50(72)}$ values of gross photosynthesis (P_g) of the two dinoflagellates, *P. lima* (22.54 PSU) and *A. minutum* (18.28 PSU) compared to the values of the diatom N1c1 (10.51 PSU) and the chlorophicea *T. suecica* (7.80 PSU). Significant difference were also found between the $IC_{50(72)}$ values of the gross photosynthesis (18.28 PSU) and these of the growth rate (8.47 PSU) and photosynthetic quantum yield (9.70 PSU) for the dinoflagellate, *P. lima*. A similar significant effect was found for the dinoflagellate *A. minutum*, with the $IC_{50(72)}$ values of the gross photosynthesis (22.54 PSU) being significantly different from the values of the growth rate (10.67 PSU) and Φ_{PSII} activity(14.69 PSU).

Comparison between linear regressions obtained for each one of the parameters tested (Figure 1) shown individual differences depending of the specie analyzed. : Comparison of linear regressions on toxicity assays of the chlorophicea *T. suecica* show no significant differences for growth rate, photosynthetic quantum yield and gross photosynthesis (Figure 1a). However, the analysis of these parameters on *Nitzschia*

N1c1 shows how this diatom exhibits greater sensitivity in photosynthetic activity towards declining salinity concentrations, while growth rates are less affected (Figure 1b).

In both dinoflagellate species, in addition to exhibiting significant differences between growth and photosynthetic activity parameters, these differences were also evident when Φ_{PSII} and P_g were compared. In both *A. minutum* (Figure 1c) as *P. lima* (Figure 1d) cell populations, the reduction of salt levels in culture medium induced more evident drops on P_g than on Φ_{PSII} .

Similarly, our results also show that the cell populations from the four phytoplankton species exhibited different low salinity stress levels when production (light phase, P_g) and consumption (dark phase, R) of oxygen were compared (Figure 2). While the reduction of salt levels in culture medium mainly affected negatively respiration (R) of *T. suecica* cell populations (Figure 3a), the dinoflagellate *A. minutum* and the diatom exhibit a higher impact in both photosynthetic parameters (Figure 3b and 3c). Only respiration is negatively affected for the dinoflagellate *P. lima* (Figure 3d).

4. Discussion

Salinity is known to be an important abiotic factor affecting phytoplankton growth. Different studies have demonstrated that, based on the determination of the optimal salinity for growth of different species, coastal species are more euryhaline than oceanic species (Brand 1984; Bolzano et al. 2011).

A reduction in salinity has a negative effect on the growth of brackish water phytoplankton but different algal groups may be affected in a different way by a salinity reduction. Within the brackish reaches of the estuary, different salinity zones containing

specific phytoplankton communities can often be discerned (Lionard et al. 2005). This indicates that different brackish water phytoplankton species have different salinity tolerances. Therefore, we can expect some algal groups to be more sensitive to a salinity reduction than others, and depends on the stratification of the water column.

The results of this experiment demonstrated a high efficiency of the mechanisms for the maintenance of ion homeostasis in *T. suecica* cells under conditions of low salinity. (see Figure 2) Plasma membrane Na⁺-transporting systems can be involved in this process providing for both passive (uptake by the cell) and active (export from the cell) Na⁺ transport (Pagis et al. 2001).

Comparison of the growth rate and photosynthetic activity between *T. suecica* and the toxic dinoflagellates and diatom species, showed that the chlorophyceae was better able to survive in low salinities. Comparative analysis among harmful algae showed that the *Nitzschia* strain N1c1 had a better general accommodation (G and P_g) to reduced salinity than the dinoflagellates studied. These results are consistent with the observations made by different authors, which show that diatoms were found to be the dominant phytoplankton group in the freshwater tidal reaches (Muylaert et al. 1997; Muylaert et al. 2000).

Alexandrium minutum exhibited strong salinity tolerance, with a range from 5 to 30 PSU. This is not surprising as the species was isolated from an estuarine lagoon with salinity fluctuation between approximately 10 and 25 PSU. As is often the case, species that tolerated low salinity can also tolerate very high salinity (Taylor and Pollinger 1987). The growth rates, however, were slightly lower than those reported for the same species (Cannon 1993; Chang and McClean 1997; Grzebyk et al. 2003).

Experimental studies have shown that *Prorocentrum* spp can grow over a broad salinity range. Although natural blooms of *Prorocentrum* spp occur across a wide

salinity range, in many studies bloom outbreaks have been correlated with declining salinities usually associated with freshwater inputs (Méndez, 1993; Cabrini, 1995; Glibert et al. 2001). Our results are in agreement with those obtained by these authors, with grow data less affected than other parameters. However, Hajdu et al. (2005) reported that Baltic clones grew between 30 and 600 mM, but exhibited optimal growth at 260-290 mM; and Tango et al. (2005) found in Chesapeake Bay high density blooms in salinity levels of 85-170 mM. Our results are in disagreement with these data because, applying these salinity levels to our results, the values considered as optimal by Hajdu et al. (2005) will induce between 28% and 34% of cell growth inhibition, and a decrease in cell density between 50% and 80% in the *Prorocentrum spp* blooms studied in Chesapeake Bay.

While *T. suecica* and *Nitzschia* N1c1 cells exhibited similar behavior when both photosynthetic parameters (P_g and Φ_{PSII}) were compared, there were significant differences between them of *A. minutum* and *P. lima* cell assays (Figure 2). These differences were more evident when the two parameters related with gross photosynthesis (R and P_n) are analyzed (Figure 3). Thus, while reduction of salinity on *T. suecica* and *P. lima* cell populations showed a higher degree of involvement on respiration rate, *Nitzschia* N1c1 and *A. minutum* cell populations exhibited a higher impact on P_n rate.

These results shown that, although direct comparisons are sometimes difficult due to the variety of methods and metrics used, there appear to be no consistent patterns in photosynthetic responses to salinity variations for all phytoplankton communities existent in estuarine ecosystems.

Our results respect to the different responses of algal photosynthetic activity demonstrate their species-specific response to low-salinity stress of different severity and, possibly, species-specific mechanisms of osmotic acclimation.

Special consideration has the fact that there is no statistical differences between growth rate, photosynthetic quantum yield and gross photosynthesis due to exposures on the chlorophyceae *T. suecica* to low salinity conditions. The best accommodation of these microalgae to short-term episodes of low salinity in estuarine environments may provide an advantage over harmful phytoplankton communities. However, some authors report the occurrence of harmful algae blooms under low salinity. According to Heil et al. (2005), *Prorocentrum* spp. blooms were able to survive in low to moderate salinities, and Thessen et al. (2005) obtained similar results in *Nitzschia* spp. communities. Thus, further studies in low-salinity and blooms must be undertaken for a better understanding of the presence of phytoplankton species in estuarine ecosystems. Maybe discrepancies between studies can be explained by inter-strain variability since strains from different geographical areas can present different adaptation capacities.

The mechanisms of the effect of low salinity on photosynthesis in marine planktonic algae remain unclear. In particular, metabolic processes underlying fixation in certain algal species under reduced salinities of 15-20 PSU are not known. Some authors believe that it is possible that the increased rate of photosynthetic carbon fixation can be due to metabolite regulation mechanisms involved in chloroplast protein synthesis (Semenenko 1978), while other authors suggest that photosynthates such as glucose act as a corepressor, and chloroplast proteins would be expressed when the quantities of the effector metabolite will be insufficient for both cytoplasmic processes and synthesis of storage polysaccharides in chloroplasts (Radchenko and Il'yash 2006). Our results does not show any increase in photosynthesis rate, contrary to this studies.

This cell metabolism rearrangement can take place after desalination to a lower level (critical salinity and below). However, the death of cells with lost membrane integrity was similar to those observed after exposure to other unfavorable factors (Veldhuis et al. 2001), causing a decrease the specific rate of the photosynthetic ratio in microalgal culture below the control level, which was observed in other microalgae (Radchenko and Il'yash 2006).

5. Conclusions

In summary, the results obtained in this study designed to assess short-term salinity responses, show that salinity decrease in culture medium induce a similarly concentration-dependent inhibition in the four cell planktonic algae. Nevertheless, all of them tolerate short-term exposures to salinities in the range 5-35 PSU, which can be explained by the osmotic acclimation exhibited by these phytoplankton communities.

Since this results shows a higher variability in the response to low salinity, is required more data in other toxic and non-toxic species, to improve the knowledge in marine phytoplankton ecology and physiology, in estuarine and other brackish environments.

Acknowledgements

This study has been supported by Spanish Government (CTM2012-34757) and the Mexican UMSNH University (CIC/11/301). The technical support of Juan José Garcia and Lara de Miguel is kindly acknowledged.

References

- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Mar. Biol. 104, 511-524.
- Bolzano, S., Sarno, D., Kooistra, W.H.C.F., 2011. Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten *Skeletonema* strains. J. Plankton Res. 33, 937-945.
- Brand, L.E., 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. Estuar. Coast Shelf Sci. 18, 543-56.
- Cabrini, M., Cataletto, B., Ganis, P., Pecchiar, I., Fonda Umani, S., 1995. Relationships between toxic phytoplankton and environmental factors in the Gulf of Trieste: multifactorial analysis. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 139-144.
- Calliari, D., Gómez, M., Gómez, N., 2005. Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de La Plata: large-scale distribution and relationship with environmental variables during a spring cruise. Cont. Shelf Res. 25, 197-210.
- Cannon, J.A., 1993. Growth in culture of toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* from the Port River, South Australia, In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 741-745.
- Chang, F.H., McClean, M., 1997. Growth response of *Alexandrium* (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance. N. Z. J. Mar. Freshwater Res. 31, 1-7.

- 367 Cole, J.J., Caraco, N.F., Peierls, B.L., 1992. Can phytoplankton maintain a positive
368 carbon balance in a turbid, freshwater, tidal estuary? *Limnol. Oceanogr.* 37, 1608-
369 1617.
- 370 Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, M., Agrelo, M., García-Villada, L., Juste, J., López-
371 Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against
372 environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictiosphaerium*
373 *chlorelloides* (Chlophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-
374 dimethyluera herbicide. *Phycologia* 40, 391-398.
- 375 Day, J.W., Hall, C.A.S., Kemp, W.M., Yáñez-Arancibia, A., 1989. Estuarine ecology.
376 John Wiley, London, 400 pp.
- 377 Domingues, R.B., Barbosa, A., Galvão, H., 2005. Nutrients, light and phytoplankton
378 succession in a temperate estuary (the Guadiana, South-western Iberia). *Est.*
379 *Coast Shelf Sci.*, 64, 249-260.
- 380 Doucette, C.J., King, K.L., Thessen, A.E., Dortch, Q., 2008. The effect of salinity on
381 domoic acid production by the diatom *Pseudo-Nitzschia multiserie*. *Nova*
382 *Hedwigia Beiheft* 133, 31-46.
- 383 García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares, E., Flores-Moya, A., Agrelo, M., Martín-
384 Otero, L., Costas, E., 2002. Evolution of microalgae in highly-stressing
385 environments: an experimental model analysing the rapid adaptation of
386 *Dictiosphaerium chlorelloides* (Chlophyceae) from sensitivity to resistance
387 mutations. *J. Phycol.* 38, 1074-1081.
- 388 Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., Maimone, G., 1996. Environmental factors and seasonal
389 occurrence of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP potential producer,
390 a Mediterranean lagoon. *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 42, 539-549.

- 391 Glibert, P.M., Magnien, R., Lomas, M.W., Alexander, J., Fan, C., Haramoto, E., Trice,
392 M., Kana, T.M. 2001. Harmful algal blooms in the Chesapeake and Coastal Bays
393 of Maryland, USA: comparison of 1997, 1998, and 1999 events. *Estuaries* 24,
394 875-883.
- 395 Granéli, E., Flynn, K., 2006. Chemical and physical factors influencing toxin content.
396 In: E Granéli and JT Turner (eds) *Ecology of harmful algae*. Ecological studies
397 189, 229-241. Springer-Verlag, Berlin.
- 398 Grzebyk, D., Béchemin, C., Ward, C.J., Vérité, C., Codd, G.A., Maestrini, S.Y., 2003.
399 Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the
400 dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *J. Plank. Res.* 25, 1185-1199.
- 401 Grzebyk, D., Berland, B., 1996. Influences of temperature, salinity and irradiance on
402 growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *J.*
403 *Plank. Res.* 18, 1837-1849.
- 404 Hajdu, S., Pertola, S., Kuosa, H., 2005. *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the
405 Baltic Sea: its occurrence and morphology. *Harmful Algae* 4, 471-480.
- 406 Hagy, III, J.D., Boynton, W.R., Jasinski, D.A., 2005. Modelling phytoplankton
407 deposition to Chesapeake Bay sediments during winter-spring: interannual
408 variability in relation to river flow. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 62, 25-40.
- 409 Heil, C.A., Glibert, P.M., Fan, C., 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller - a
410 review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance.
411 *Harmful Algae* 4, 449-470.
- 412 Kies, L., 1997. Distribution, biomass and production of planctonic and benthic algae in
413 the Elbe estuary. *Limnologica* 27, 55-64.
- 414 Kirst, G.O., 1990. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Ann. Rev. Plant*
415 *Physiol. Plant Mol. Biol.* 40,21-53.

- 416 Kocum. E., Nedwell. D.B., Underwood, G.J.C. 2002. Regulation of phytoplankton
417 primary production along a hypernutrified estuary. Mar. Ecol. Prog. Ser. 231, 13-
418 22.
- 419 Kromkamp, J., Peene, J., 1995. On the possibility of net primary production in the
420 turbid Schelde estuary (SW Netherlands). Marine Ecol. Progr. Series 121, 249-
421 259.
- 422 Larocque, R., Cembella, A.D. 1990. Ecological parameter associated with the seasonal
423 occurrence of *Alexandrium* spp. and consequent shellfish toxicity in the lower St.
424 Lawrence estuary (East Canada), In: Granéli, E.P., Sundström, B., Edler, L.,
425 Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp.
426 368-373.
- 427 Lim, P.T., Leaw, C.P., Usup, G., 2002. First paralytic shellfish poisoning in the east
428 coast of Peninsula Malaysia, Asia Pacific Conference on Marine Science and
429 Technology, Kuala Lumpur, Abstract 2002.
- 430 Lim, P.T., Ogata, T., 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four
431 tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). Toxicon 45, 699-710.
- 432 Lionard, M., Muylaert, K., Van Gansbeke, D.V., Vyverman, W., 2005. Influence of
433 changes in salinity and light intensity on growth of phytoplankton communities
434 from the Schelde river and estuary (Belgium/The Netherlands). Hydrobiologia
435 540, 105-115.
- 436 Lucas, L.V., Koseff, J.R., Cloern, J.E., Monismith, S.G., Thompson, J.K., 1999.
437 Processes governing phytoplankton blooms in estuaries I: The local production-
438 loss balance. Mar. Ecol. Prog. Ser. 187, 1-15.

- 439 Malone, T.C., Neale, P.J., Boardman, D., 1980. Influences of estuarine circulation on
440 the distribution and biomass of phytoplankton size fractions. In: Kennedy, V.
441 (ed.), *Estuarine Perspectives*. Academic Press, New York. pp. 249-262.
- 442 Méndez, S.M., 1993. Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results
443 (1990–1991). In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms*
444 *in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 287-291.
- 445 Moon, C., Dunstan, W.M., 1990. Hydrodynamic trapping and the formation of the
446 chlorophyll a peak in the turbid, very low salinity waters of estuaries. *J. Plankton*
447 *Res.* 12, 323-336.
- 448 Mortonl S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W. 1992. Effect of temperature, salinity and light
449 intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with
450 ciguatera. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 157, 79-90.
- 451 Muylaert, K., Sabbe, K., Vyverman, W., 2000. Spatial and temporal dynamics of
452 phytoplankton communities in a freshwater tidal estuary (Schelde, Belgium).
453 *Estuar. Coast Shelf Sci.* 50, 673-687.
- 454 Muylaert, K., Tackx, M., Vyverman, W., 2005. Phytoplankton growth rates in the
455 freshwater tidal reaches of the Schelde estuary (Belgium) estimated using a
456 simple light-limited primary production model. *Hydrobiologia* 540, 127-140.
- 457 Muylaert, K., Van Kerkvoorde, A., Vyverman, W., Sabbe, K., 1997. Structural
458 characteristics of phytoplankton assemblages in tidal and non-tidal freshwater
459 systems: a case-study from the Schelde basin. *Freshwater Biol.* 38, 263-276.
- 460 Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W.,
461 Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., Bohnert, H.J., 2002. Monitoring large-scale
462 changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol.*
463 *Biol.* 48, 551-573.

- 464 Pagis, L.Y., Popova, L.G., Andreev, I.M., Balnokin, Y.V., 2001. Ion specificity of Na⁺-
465 transporting systems in the plasma membrane of the halotolerant alga *Tetraselmis*
466 (*Platymonas*) *viridis* Russ. J. Plant Physiol. 48, 281-286.
- 467 Poulton, N.J., Keafer, B.A., Anderson, D.M., 2005. Toxin variability on
468 natural populations of *Alexandrium fundyense* in Casco Bay, Maine -evidence of
469 nitrogen limitation- Deep Sea-Res. II 52, 2501-2521.
- 470 Radchenko, I.G., Il'yash, L.V., 2006. Growth and Photosynthetic Activity of Diatom
471 *Thalassiosira weissflogii* at Decreasing Salinity. Plant Physiol. 33, 242-247.
- 472 Semenenko, V.E., 1978. Molecular Biological Aspects of Endogenous Regulation of
473 Photosynthesis. Fiziol. Rastenii. 25, 903-921.
- 474 Schreiber, U., Mueller, J.F., Haugg, A., Gademann, R., 2002. New type of dual-channel
475 PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests.
476 Photosynth. Res. 74, 317-330.
- 477 Soetaert, K., Van Rijswijk, P., 1993. Spatial and temporal patterns of the zooplankton in
478 the Westerschelde estuary. Marine Ecol. Progr. Series 97, 47-59.
- 479 Strizh, I.G., Popova, L.G., Balnokin, Y.V., 2004. Physiological aspects of adaptation of
480 the marine microalga *Tetraselmis* (*Platymonas*) *viridis* to various salinity media.
481 Rus. J. Plant Physiol. 51, 176-182.
- 482 Tango, P.J., Magnien, R., Butler, W., Lacouture, R., Sellner, K., Glibert, P.,
483 Luckenbach, M., Poukish, C., Luckett, C., 2005. Characterization of impacts and
484 potential effects due to *Prorocentrum minimum* blooms in Chesapeake Bay.
485 Harmful Algae 4, 525-531.
- 486 Taylor, F.J.R., Pollinger, U., 1987. Ecology of dinoflagellates, In: Taylor, F.J.R. (Ed.),
487 The Biology of Dinoflagellates. Blackwell, London, pp. 399-529.

- 488 Thessen, A.E., Dortch, Q., Parsons, M.L., Morrison, W., 2005. Effect of salinity on
489 *Pseudo-Nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. J. Phycol.
490 41, 21-49.
- 491 Tyler, M.A., Seliger, H.H., 1978. Annual subsurface transport of a red tide
492 dinoflagellate to its bloom area: water circulation patterns and organism
493 distributions in the Chesapeake Bay. Limnol. Oceanogr. 23, 227-246.
- 494 Underwood, G., Phillips, J., & Saunders, K., 1998. Distribution of estuarine benthic
495 diatom species along salinity and nutrient gradients, Eur. J. Phycol. 33, 173-183.
- 496 Van Spaendonk, J.C.M., Kromkamp, J., De Visscher, P.R.M., 1993. Primary production
497 of phytoplankton in a turbid coastal plain estuary (The Netherlands). Netherlands
498 J. Sea Res. 31, 267-279.
- 499 Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., Timmermans, K.R., 2001. Cell death in phytoplankton:
500 correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity,
501 pigmentation and growth. Eur. J. Phycol. 36, 167-177.

Figure captions

Figure 1. Linear regressions corresponding to growth rate (●), photosynthetic quantum yield activity (▲) and gross photosynthesis (◆) inhibitory response induced on *Tetraselmis suecica* (a), *Nitzschia N1c1* (b), *Alexandrium minutum* (c) and *Prorocentrum lima* (d) communities exposed to decreasing concentrations of salinity in the culture media. Points represent means with vertical lines showing standard deviation (n=8).

Figure 2. Graphics representing oxygen levels recorded with Clark electrode during dark (▼) and light (∇) phases which were subjected the seawater phytoplankton *Tetraselmis suecica* (a), *Nitzschia N1c1* (b), *Alexandrium minutum* (c) and *Prorocentrum lima* (d) communities exposed to decreasing concentrations of salinity in the culture media.

Figure 3. Maximum rate of net photosynthesis (P_n) and dark respiration rate (R) plotted against the selected concentrations of salinity applied in toxicity assays on *Tetraselmis suecica* (a), *Nitzschia N1c1* (b), *Alexandrium minutum* (c) and *Prorocentrum lima* (d) communities. Bars represent means with vertical lines showing standard deviation (n=8). Asterisks (*) represent significant differences ($p<0.05$) between P_n and R.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

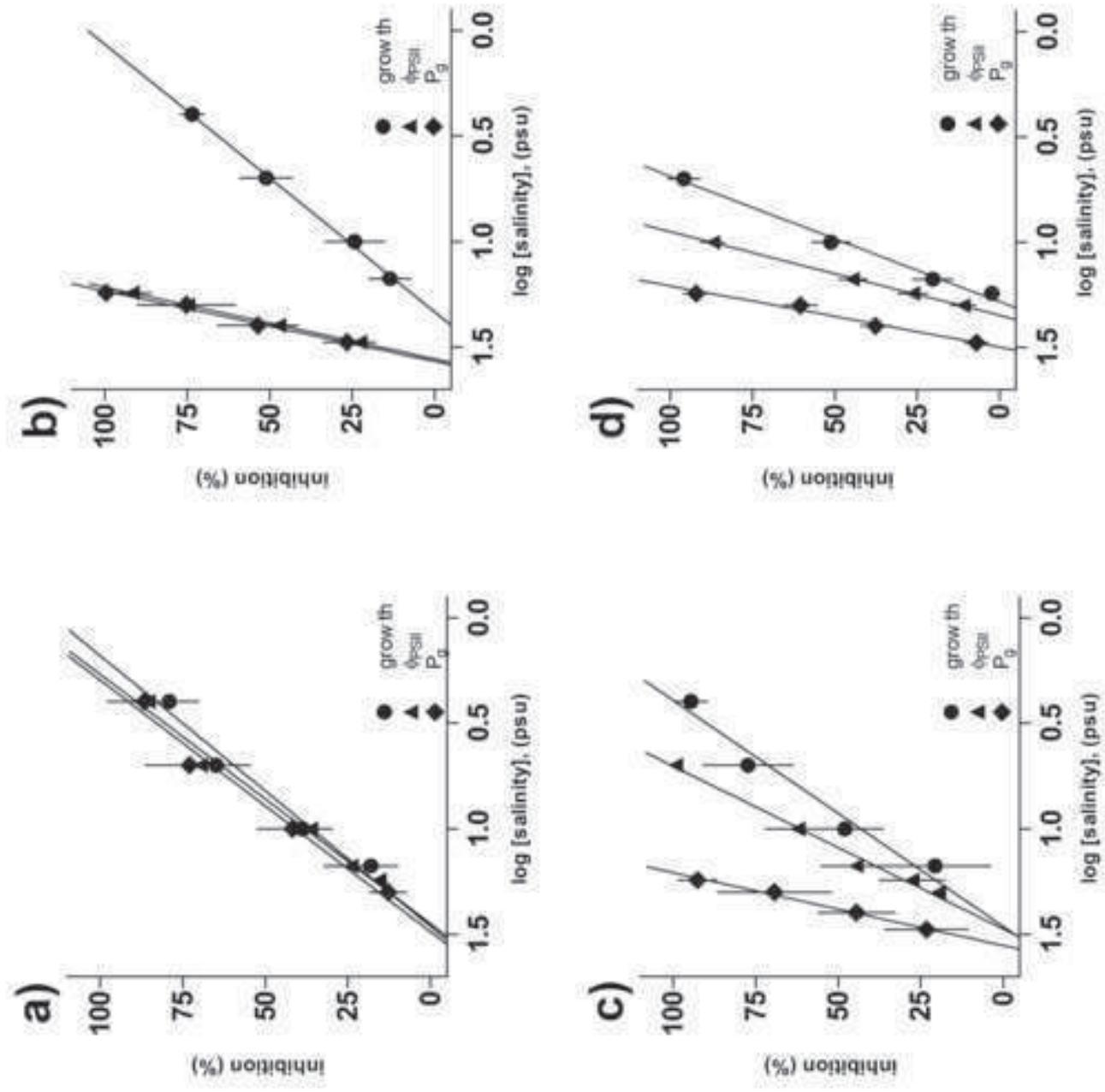


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

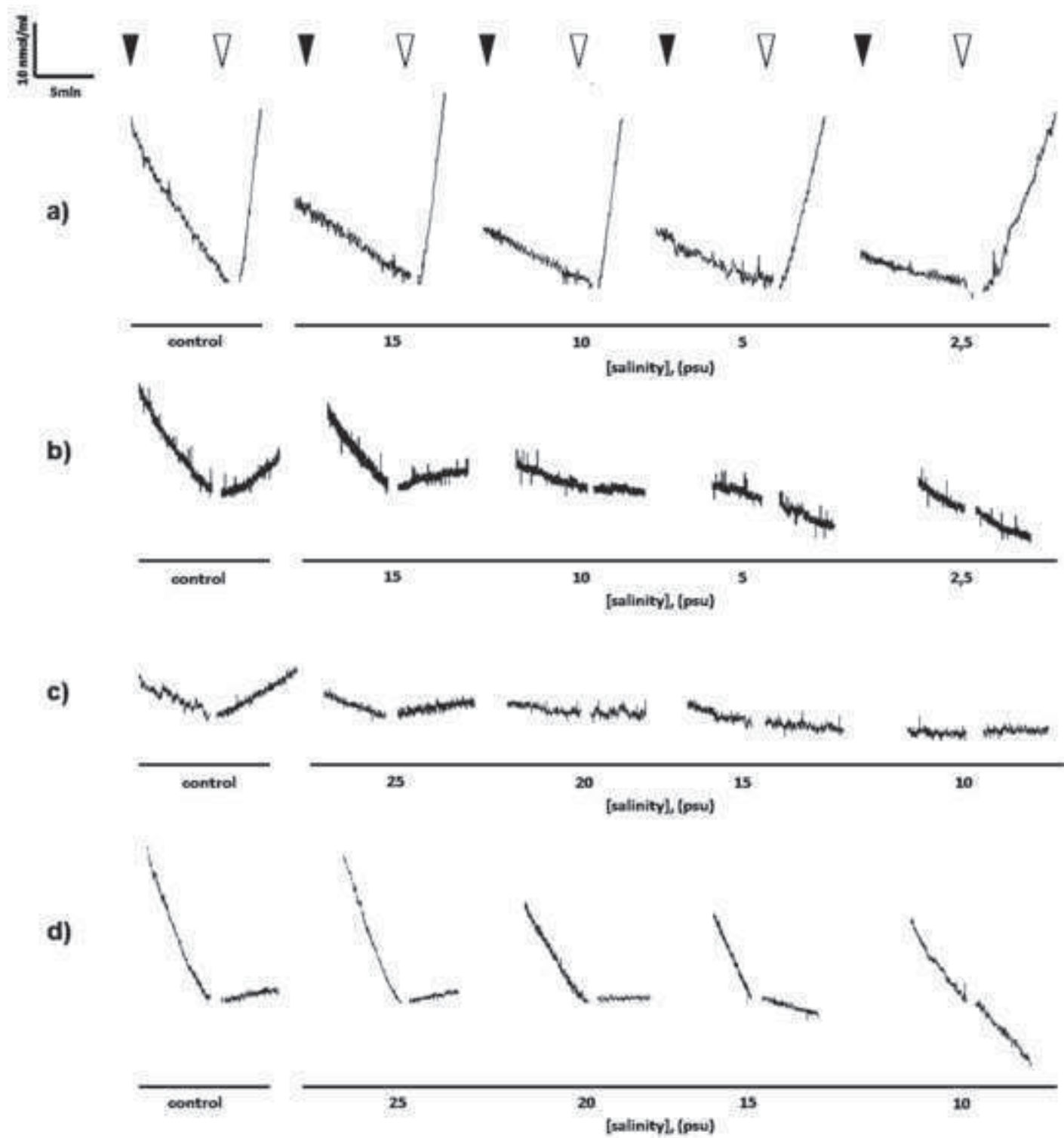


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

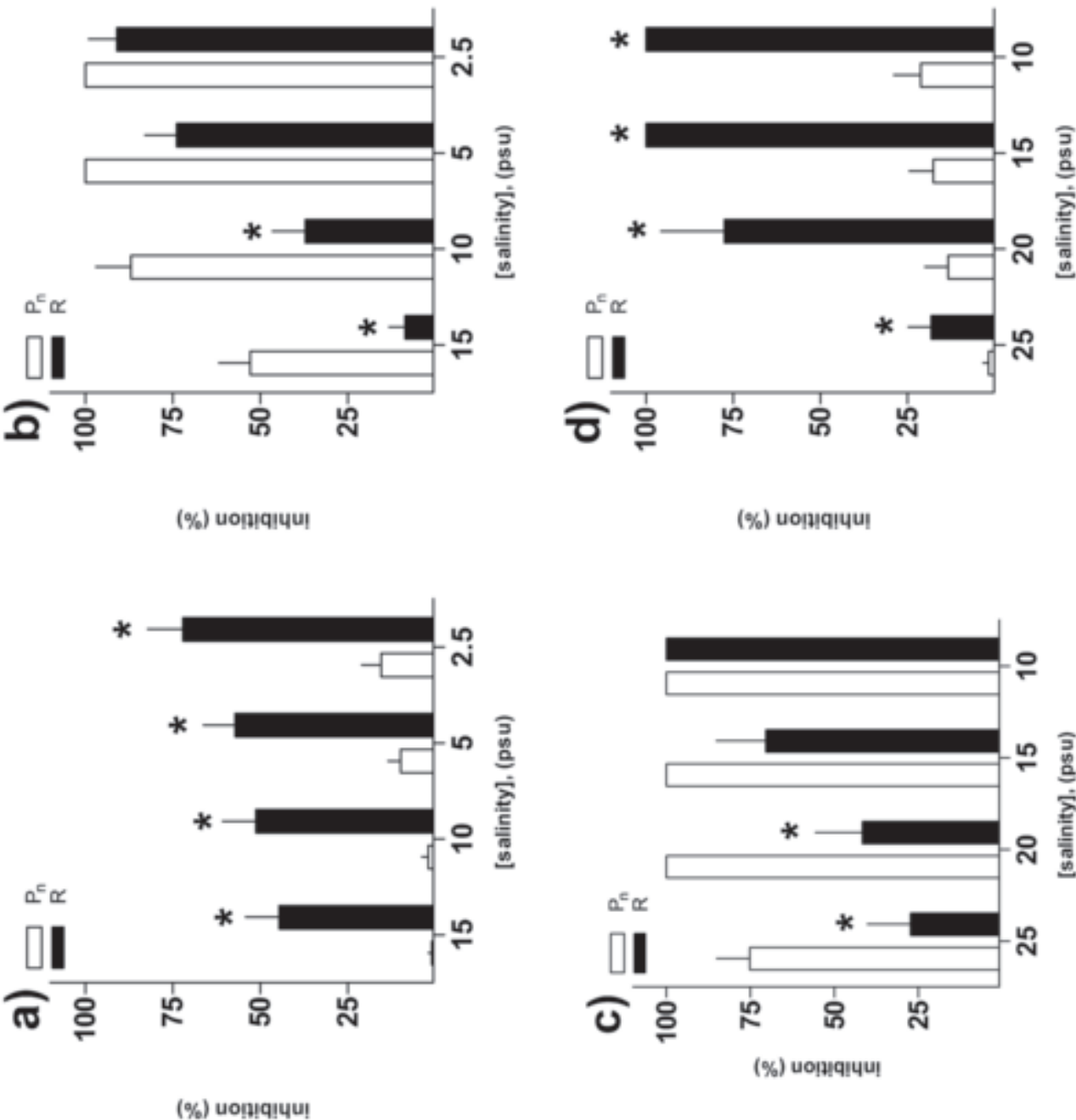


Table 1

Table 1. 72-h median inhibitory concentration of salinity [$IC_{50(72)}$] and their corresponding confidence limits (CL95%) of growth rate (G), photosynthetic quantum yield activity (Φ_{PSII}) and gross photosynthesis (P_g), obtained in the nontoxic green microalgae *Tetraselmis suecica*, in the harmful diatom *Nitzschia* (N1c1) and in the harmful dinoflagellates *Alexandrium minutum* and *Prorocentrum lima*. Each $IC_{50(72)}$ value was obtained from the values obtained in 8 replicates (n=8) and are expressed in PSU.

Organism	n	$IC_{50(72)}$ (CL 95%)		
		G	Φ_{PSII}	P_g
<i>Tetraselmis suecica</i>	8	6.63 (4.24-10.42)	7.23 (6.03-8.57)	7.80 (5.28-12.19)
<i>Nitzschia</i> (N1c1)	8	5.57 (4.93-6.02)	9.28 (8.22-10.54)	10.51 (9.49-11.83)
<i>Alexandrium minutum</i>	8	8.47 (5.54-11.10)	9.70 (7.75-12.39)	18.28 ^{a*} (16.11-21.34)
<i>Prorocentrum lima</i>	8	10.67 (9.60-11.78)	14.69 ^{ab} (13.58-15.81)	22.54 ^{ab*} (20.28-25.00)

^{ab}: Significant differences (p<0.05) respect to values corresponding to *Tetraselmis suecica* (^a) and *Nitzschia* (N1c1) (^b), respectively.

*: Significant differences (p<0.05) respect to values corresponding to growth and Φ_{PSII} .

5.5. RISK ASSOCIATED WITH TOXIC BLOOMS OF MARINE PHYTOPLANKTON FUNCTIONAL GROUPS ON *ARTEMIA FRANCISCANA*.

Importance of strain type to predict the toxicological risk associated with *Microcystis aeruginosa* blooms: comparison of Microtox® analysis and immunoassay

A. D'ors, M. C. Bartolomé and S. Sánchez-Fortún

ABSTRACT

The occurrence of toxic cyanobacterial blooms in aquatic environments, associated with human health problems and animal deaths, has increased the need for rapid, reliable and sensitive methods to determine the toxicity of microcystin produced by cyanobacteria. An *in vitro* Microtox® system and a commercially available microcystin ELISA were used to screen out the potential risk associated with selected *Microcystis aeruginosa* strains (Ma1D–Ma8D). Results showed the existence of three differentiated groups in the selected *M. aeruginosa* strains. Strains Ma7D and Ma6D were determined to be very toxic, strains Ma2D, Ma1D and Ma5D as moderately toxic and strains Ma8D, Ma4D and Ma3D as non-toxic. These results agreed with the microcystin concentration values obtained by immunoassay. Although the data obtained by other authors clearly show that Microtox® is not sensitive to microcystins, our results suggested that this bioluminescence assay may prove useful in the preliminary screening of cyanobacterial blooms for microcystin-based toxicity. Additionally, the combination of immunodetection and toxicity-based Microtox® provides a useful addition to the methods already available for detection of cyanobacterial toxins.

Key words | environmental risk, immunoassay, *Microcystis aeruginosa* strains, Microtox®, toxigenicity

A. D'ors

S. Sánchez-Fortún (corresponding author)
Dpto. Toxicología y Farmacología,
Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense de Madrid,
Avenida Puerta de Hierro, s/n,
28040 Madrid,
Spain
E-mail: fortun@vet.ucm.es

M. C. Bartolomé

Facultad de Quimicofarmacología,
Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo,
Calle Santiago Tapia, n° 43,
58000 Morelia (Michoacán),
México

INTRODUCTION

Some species and strains within the freshwater cyanobacterial (blue-green algal) genera *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* and *Nostoc* are known to produce cyclic heptapeptide liver toxins (Carmichael 1997). Microcystins are the most common group of hepatotoxins. To date, over 80 structural variants have been characterized from field samples or isolated strains (Krüger *et al.* 2009). Cyanobacterial toxins can cause illness and death in animals such birds and fish (Codd *et al.* 1989; Carmichael 1992). Consumption of both cyanobacteria and water containing released toxins may cause poisoning. The lethal dose depends on the type of cyanobacterial toxins and species of cyanobacteria, as well as on the age, weight and gender of the exposed organism (Palus *et al.* 2007).

Toxic cyanobacterial blooms in waterbodies used for recreation and drinking constitute hazards to human

health by skin contact and ingestion (Falconer 1989). Weather factors, such as temperature (15–30 °C), windless weather and water pH (pH 6–9), also play an important role in the formation of algal blooms (Palus *et al.* 2007). Up to 50% of natural blooms reported in many European countries are related to freshwater cyanobacterial species. Of these, at least 25% were considered toxic (WHO 1999).

One of the first difficulties encountered in confirming a toxic algal bloom is distinguishing it from a non-toxic one. This is because the same species may produce both toxic and non-toxic strains (Volterra *et al.* 2006). Environmental factors may affect microcystin production in *Microcystis* cultures by a factor of 3 to 4 (Sivonen & Jones 1999). However, the capability for microcystin production as such is genetically determined. Strains isolated from the same bloom

6. DISCUSIÓN

Every scientific statement is provisional. Politicians hate this. How can anyone trust scientists? If new evidence comes along, they change their minds.

Terry Pratchett.

6.1 AFLORAMIENTOS Y SALINIDAD.

En los estuarios encontramos un mapa de salinidad complejo. En las zonas más altas observamos aguas con concentraciones similares a las de la fuente de agua dulce, normalmente el río. En las zonas más bajas la salinidad se asemeja a la de las aguas costeras, existiendo todo un gradiente horizontal y estratificación vertical entre unas y otras. Por último, al ser áreas de gran extensión y baja profundidad, la evaporación juega un importante rol en la composición del agua, formándose grandes zonas hipersalinas con su bioma asociado.

Hemos considerado estudiar las variaciones de salinidad en esta tesis por ser un factor clave en la distribución del fitoplancton, ya que pequeños cambios en la concentración salina pueden suponer grandes retos para los organismos que habitan las áreas costeras (Wikner and Anderson, 2012). La exposición a una mayor concentración salina puede inducir efectos directos o indirectos en la supervivencia, metabolismo, crecimiento, reproducción y/o balance osmótico de las especies acuáticas. (Kinne, 1993). Trabajando con la clorofita *Dictyosphaerium chlorelloides* y la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* buscamos saber si existen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad hacia la sal de ambas especies; y si el aumento de salinidad afecta más al crecimiento o a la fotosíntesis, distinguiendo en el caso de la eucariota entre fotosistemas I y II. Todas estas posibles situaciones afectarán a la presencia y distribución de especies fotosintéticas tras un cambio en la salinidad, a la composición en la dieta del zooplancton y por tanto a sus interacciones y redes tróficas.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la cianobacteria es más sensible al estrés salino que la eucariota, si bien el aumento de salinidad disminuye la producción de oxígeno en ambas. Estos datos guardan correlación con los obtenidos por von Alvensleben *et al.* (2013) quienes también obtuvieron altas tolerancias a salinidad (2-

36 ppt) en la clorofita *Picochlorum atomus*, permitiendo el tratamiento con sal en contaminaciones por cianobacterias de los cultivos de algas verdes (clorofitas).

Un *bloom* o afloramiento tóxico de cianobacterias puede afectar al zooplancton no sólo por el riesgo de la propia toxina sino también por cambios en la estructura y composición del fitoplancton, que afecten a las especies de las que se alimentan. Así, ante un escenario de aumento (natural o artificial) en la concentración salina, es de esperar que la clorofita (*D. chlorelloides*) no tóxica se vea menos afectada que las cianobacterias causantes del afloramiento (*M. aeruginosa*), por lo que no parece probable que el fitoplancton tóxico desplazara al habitual ni comprometiera la alimentación de las artemias, aunque tanto el crecimiento como la fotosíntesis de *D. chlorelloides* disminuyan ligeramente. En el caso del estuario de Doñana vimos que la influencia de las mareas abarca hasta 89 Km río arriba (ver Introducción), por lo que esta salinidad aumentada es una circunstancia frecuente. Sin embargo, en momentos de grandes precipitaciones, especialmente si coinciden con la bajamar, esta tendencia puede invertirse aumentando el riesgo de que se produzcan afloramientos. Es importante señalar que en estas condiciones (incremento de la entrada de agua dulce) la estratificación de la columna de agua se acentúa, dividiéndose claramente en una zona superior más favorable (con menor salinidad y mayor intensidad de luz solar) y una inferior más desfavorable. En este escenario, las cianobacterias tienen ventaja ya que gracias a un mecanismo de colección de vesículas de gas en el citoplasma que pusieron de manifiesto Dervaux *et al.* (2015) pueden situarse en la zona superior de la columna de agua con mayor facilidad que las cianofitas, lo que favorece su expansión y produce un efecto sombra que dificulta el crecimiento del fitoplancton situado en la zona inferior de la columna de agua.

Además, gracias a su alta tasa de duplicación, la población se renueva rápidamente aumentando los requerimientos de oxígeno (que se agotan) y produciendo una gran cantidad de residuos que al ser consumidos por las bacterias multiplican este efecto.

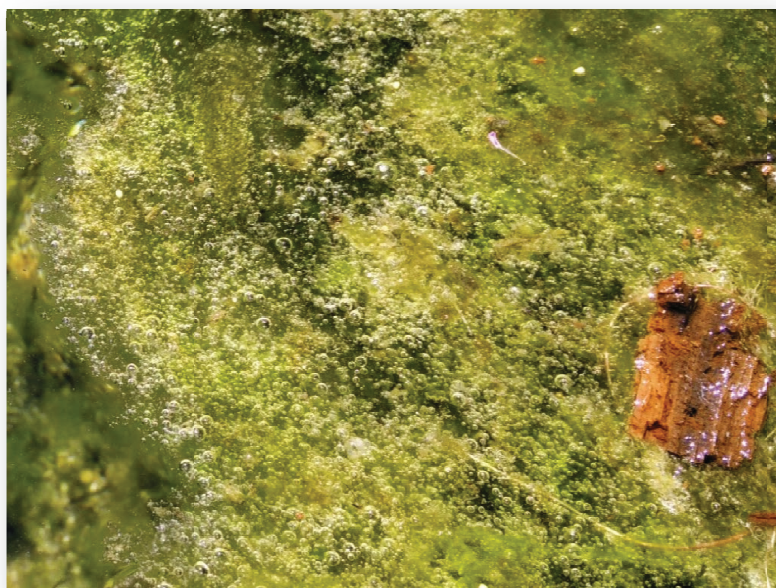


FIGURA 6.1 (A) VESÍCULAS DE GAS EN TAPIZ DE CIANOBACTERIAS

En cuanto al efecto tóxico de las microcistinas sobre el branquiópodo, los resultados de nuestro segundo artículo concluían que no había diferencias significativas en la exposición a cianobacterias enteras o a sus extractos, por lo que aunque las procariotas vean afectado su metabolismo, se lisen por presión osmótica o mueran, habría una ventana de tiempo, variable según los factores físico-químicos y dinámicas del ecosistema, durante la cual persistiría el riesgo para el zooplancton y también para el resto de la red trófica, que terminaría con la degradación de las toxinas y/o dilución de los restos celulares en la columna de agua. La configuración geográfica del estuario, en forma de marismas que se extienden en un área grande y de baja profundidad, facilita que los restos celulares de los afloramientos se sequen y formen aerosoles que puedan ser arrastrados por el viento, extendiendo la zona de riesgo (OMS 2011).

Ghadouani *et al.* y otros autores sostienen que algunas especies de zooplancton pueden rechazar activamente las cepas tóxicas de *Microcystis* por lo que sería necesario estudiar qué sucede en este caso, para calcular el riesgo de *Artemia* en afloramientos de composición mixta, con cepas productoras y no productoras de toxinas. Un trabajo previo a esta tesis doctoral realizado en nuestro laboratorio (ver Figura 6.1 (B)), en el que se exponían las artemias a una mezcla en proporción

creciente de cepas tóxicas de *M. aeruginosa* y *D. chlorelloides*, concluyó que la intoxicación era menor a la esperada cuando las artemias disponían de un recurso alimentario alternativo a las cianobacterias tóxicas. Pero aunque los resultados apunten a confirmar la hipótesis de Ghadouani es importante tener en cuenta la diferencia considerable de tamaño entre una célula procariota y una eucariota, que permitiría a las artemias establecer un criterio fácil de discriminación incluso pasiva, ya que se alimentan por filtración del medio: Es posible que las células más grandes (no tóxicas) queden retenidas y digeridas, mientras que una mayor cantidad de cianobacterias vuelvan a salir sin ser consumidas con el agua de retorno.

Una parte importante de las conclusiones obtenidas es la confirmación de que no existe relación directa entre la producción de microcistina-LR y la concentración celular, por lo que protocolos basados únicamente en el número o concentración de células no pueden valorar correctamente el riesgo toxicológico de un afloramiento. Esto es debido principalmente a dos factores: Inclusión de genotipos tóxicos y no tóxicos en el conteo y variabilidad dentro de la misma cepa en la producción de microcistina, bien relacionada con el crecimiento, o como señalan Carrillo *et al.* (2003) tras un cambio repentino en las condiciones físico-químicas del ambiente.

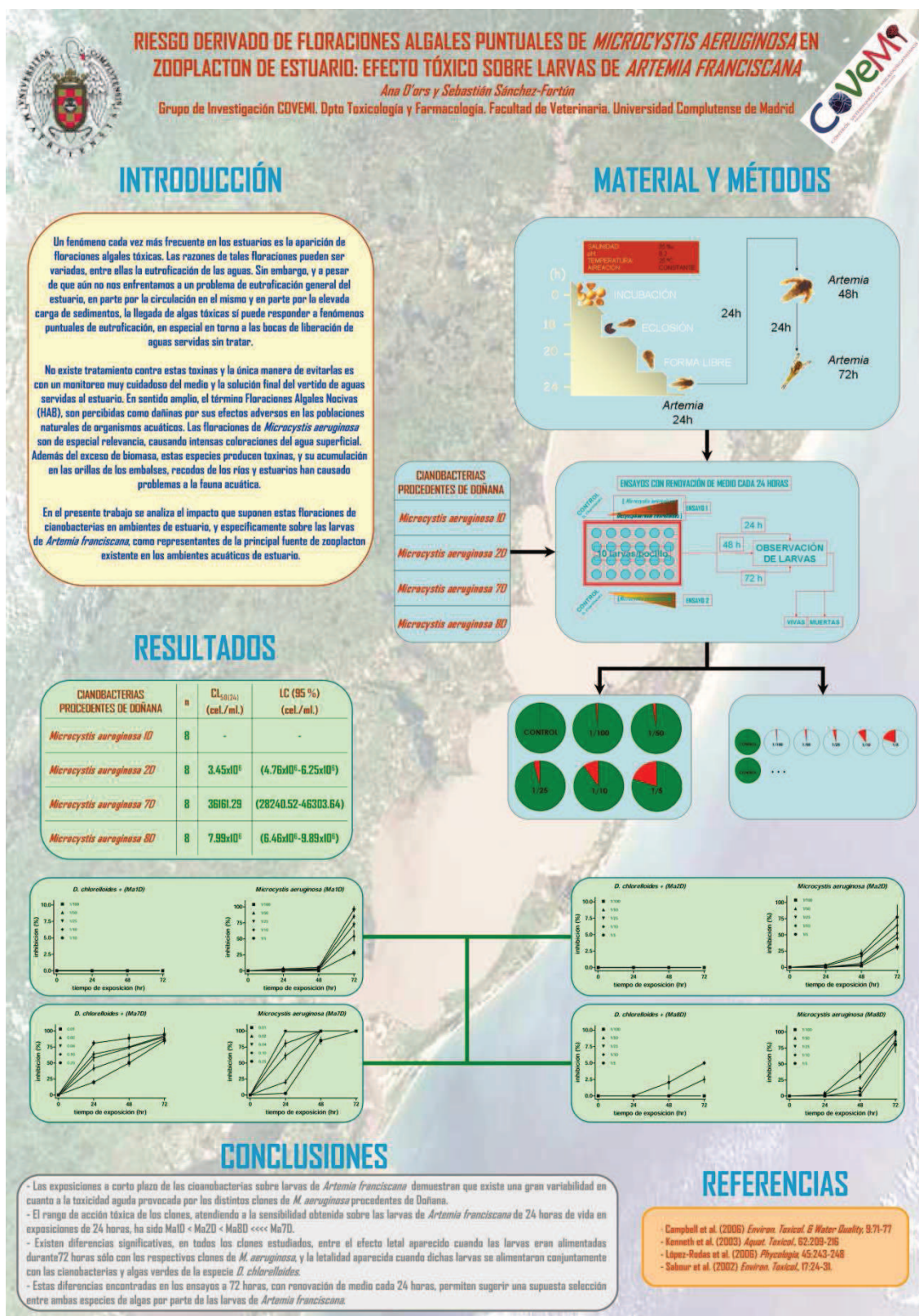


FIGURA 6.1 (B) RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE COMIDA POR NAUPLIOS DE ARTEMIA.

Por lo tanto, podemos concluir que las zonas del estuario con altas concentraciones de sal (zonas bajas y de evaporación) tienen menos riesgo de afloramientos tóxicos, que

la presencia de fitoplancton eucariota es un factor de protección frente a la toxicidad del afloramiento aunque su crecimiento y fotosíntesis se limitan, y que debido a la alta variabilidad en la producción de microcistina-LR es necesaria una caracterización ecotoxicológica del afloramiento en función de las cepas dominantes en él para predecir el riesgo sobre el zooplancton y resto de la red trófica.

6.2 MICROTOX® COMO MÉTODO ESTANDARIZADO DE UTILIDAD EN AFLORAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS

Los sistemas de bioluminiscencia bacteriana (Microtox®, ToxAlert® o Biotox®) son útiles para los ensayos preliminares de contaminantes en el medio ambiente (agua y suelo). Son sistemas sensibles a la mayoría de los compuestos tóxicos, que utilizan operaciones sencillas y cercanas al tiempo real (USEPA 2004). A pesar de su simplicidad, permiten hacerse una idea del impacto de los tóxicos en el ambiente de la muestra. Un ejemplo de estos sistemas es Microtox® que utiliza la bioluminiscencia de *Vibrio fischerii*. Pese a que tiene ciertas limitaciones para su uso en ambientes tropicales y subtropicales, debido a que su temperatura óptima es de 15°C ya que la luminiscencia se ve afectada a temperaturas superiores (Halmi *et al.* 2014), ha sido ampliamente utilizado para testar metales pesados (Agnieszka *et al.* 2014), hidrocarburos de petróleo (Heinlaan *et al.* 2007) o pentaclorofenol (Mueller *et al.* 1991).

Aplicado a sistemas de alerta temprana en afloramientos de cianobacterias, tiene una historia de controversia. En 1990, Lawton *et al.* proponen su uso como cribado preliminar en afloramientos con peligrosidad basada en la microcistina-LR, publicando un estudio que lo avala con sus buenos resultados (Lawton *et al.* 1990). Sin embargo, en 1994 el mismo equipo (Campbell *et al.* 1994) publica una comparación de este ensayo con *Artemia*, sobre cianobacterias productoras y no productoras de microcistina, concluyendo que la mayor inhibición de la bioluminiscencia se produjo al interactuar con cepas no productoras de microcistina-LR (Mientras que en *Artemia* la mayor mortalidad se produjo en las productoras) y que por lo tanto la toxicidad que refleja el ensayo Microtox® debe ser explicada en base a otros compuestos presentes

en las cianobacterias, distintos a la microcistina-LR. Otros estudios que comparaban a su vez estas dos mismas pruebas con el bioensayo estandarizado de ratón (Vezie *et al.* 1996) obtuvieron similares resultados, mostrando ser el ensayo con *Artemia* más similar al standard que la bioluminiscencia. Sin embargo, Microtox® ha sido utilizado con éxito para la detección de otras toxinas naturales procedentes de otras cianobacterias (Bruno *et al.* 1994), dinoflagelados (Bruno *et al.* 1990) u hongos (Alba *et al.* 2009). Pese a esta falta de acuerdo, la bibliografía disponible sobre este tema es bastante escasa, no parece haberse profundizado demasiado en cuanto a este posible uso en alerta temprana de riesgo en afloramientos de cianobacterias. Y precisamente por la propia naturaleza de la herramienta (un test de toxicidad para el que no necesitamos conocer con precisión el compuesto que estamos buscando) nos parece que es útil porque no detecta una sola toxina, sino que aporta una idea general de la toxicidad presente, sobre todo teniendo en cuenta la principal ventaja de este ensayo, que es la rapidez en la obtención de resultados, que permite actuar antes y reducir las posibles consecuencias del afloramiento.

Sin que fuera el objetivo principal, en nuestros trabajos se aporta información que aunque no replica el experimento de Campbell *et al.* (1994) nos permite saber si apoyamos o contradecemos su hipótesis con nuestros datos. Comparamos Microtox® con un inmunoensayo (EnviroGard®) que detecta específicamente microcistina, permitiéndonos clasificar diferentes cepas de *Microcystis aeruginosa* en base a la producción de esta toxina, y comprobar si existe una correlación entre la inhibición de la bioluminiscencia producida por cada una de estas cepas y su contenido en microcistina-LR. En este caso, sí que se encontró una correlación entre ambos ensayos. Utilizando las mismas cepas en otro de los ensayos realizados, comprobamos que esta correlación se mantenía cuando probábamos su toxicidad aguda sobre nauplios de *Artemia* de 24h, por lo que discrepamos de los resultados obtenidos por el equipo de Campbell y Lawton (1994) y por el de Vezie (1996): No sabemos si la inhibición de la bioluminiscencia se debe únicamente a la microcistina, pero nuestros resultados apuntan a que ésta juega un importante papel en su aparición.

La clasificación de cualquier muestra de *Microcystis aeruginosa* procedente de un afloramiento, como cepa muy tóxica, moderadamente tóxica o no tóxica, tiene un gran valor en predicción y evaluación del riesgo del *bloom*, permitiendo poner en marcha protocolos de contención y remediación y aportando datos objetivos para la toma de decisiones.

Aunque la escasez de recursos muchas veces es una limitación muy importante, debido al propio carácter multifactorial de los afloramientos de cianobacterias (especies y cepas que lo forman, climatología, factores antropogénicos o naturales que favorezcan o reduzcan su extensión, etc), y a la incertidumbre en cuanto a su evolución, resulta imposible reducir su monitorización y control a un solo método que englobe todas las ventajas y minimice los inconvenientes. Algunos métodos de uso muy extendido (como el bioensayo en ratón) no parecen ser la mejor solución ni ética ni económicamente, por lo que un sistema que englobe varios ensayos (bioluminiscencia, caracterización de especies, inmunodetección de toxinas, toxicidad aguda sobre un modelo de zooplancton, etc.) optimizando el uso de cada una de ellas, siempre será más fiable y completo que el uso de cada uno de ellos por separado.

6.3 FITOPLANCTON MARINO EN EL ESTUARIO

Los organismos habituados al medio marino, con una concentración de sales disuelta mayor a la de las aguas continentales, pueden ver comprometidos sus mecanismos de regulación osmótica al enfrentarse a aguas con una menor salinidad. Las diferencias entre especies en este proceso de aclimatación, así como la forma en la que se vean afectados diferentes aspectos de su metabolismo (Crecimiento, balance de oxígeno, rendimiento del fotosistema II) van a marcar la evolución del afloramiento en su extensión por el estuario.

Es lógico pensar que un descenso de salinidad va a afectar negativamente a las especies marinas, siendo más eurihalinas las especies costeras que las oceánicas, pero la respuesta final de cada especie va a depender en última instancia de la eficiencia de sus mecanismos de homeostasis.

Según los datos obtenidos, la $EC_{50(72)}$ de *Microcystis aeruginosa* (a quien un aumento en la salinidad perjudica) estaba en una concentración de sal de 76,6 mM, que corresponde a unos 44,76 PSU, mientras que en las especies marinas tóxicas (a quienes favorece un aumento en la salinidad) obtuvimos una $EC_{50(72)}$ de 5,57, 8,47 y 10,67 PSU para *Nitzschia sp. N1C1*, *Alexandrium minutum* y *Prorocentrum lima* respectivamente. Esto quiere decir que en zonas de salinidades comprendidas entre 5 y 40 PSU, presentes por el gradiente salino en el estuario (Telesh and Khlebovich, 2010) tanto el fitoplancton tóxico de agua dulce como el de agua salada podrían sobrevivir y ocasionar problemas.

Vemos que entre los organismos marinos el más resistente a la disminución en la concentración de sales fue la diatomea, y entre los dos dinoflagelados *A. minutum* resultó ser más resistente que *P. Lima*. Este dato es coherente con algunos que señalan la importancia de *A. minutum* en afloramientos en zonas muy diversas del Mediterráneo (Casabianca *et al.* 2012), mientras que *P. lima*, aunque más distribuido globalmente, por su carácter bentónico produce un menor número de episodios tóxicos y de menor extensión (Pistocchi *et al.* 2012). En cuanto a la diatomea *Nitzschia sp. N1C1*, en la mayoría de casos descritos de envenenamiento amnésico por consumo de bivalvos (ASP) la especie productora de ácido domoico pertenecía al género *Pseudonitzschia* (Fernandes *et al.* 2014), pero también está descrita la producción de toxinas por una especie del género *Nitzschia* (*Nitzschia navis-varíngica*) cuyas citas corresponden todas a aguas salobres y cuya producción de ácido domoico es comparable a la de *Pseudonitzschia multiseries* (Kotaki *et al.* 2004), por lo que pensamos que podría estar relacionada con la cepa estudiada por nosotros, aún sin clasificación definitiva, que producía 4,32 de equivalentes de toxina, similar a los resultados presentados por estos autores.

Los resultados obtenidos tras la exposición a aguas de salinidad decreciente muestran que ambos dinoflagelados y la diatomea podrían sobrevivir en las condiciones normales presentes en el estuario, y los resultados al exponer nauplios de *Artemia* a estas especies tóxicas y sus extractos, muestran que suponen un riesgo para el zooplancton que podría extenderse por la red trófica. Así, ante una amenaza de marea

roja o afloramiento es necesario tomar medidas urgentes, ya que no podemos confiar en que las condiciones naturales de salinidad del estuario supongan un problema que limite naturalmente el alcance del episodio.

En cuanto a las interacciones entre sí al formar parte de afloramientos mixtos (compuestos por más de una especie) teniendo siempre presente que los efectos de dicha interacción pueden ser diferentes en función del organismo que estemos testando, podemos destacar que para el caso de los nauplios de *Artemia*, la toxicidad de las combinaciones binarias y ternarias fue significativamente más baja que la de cada especie estudiada por separado (en cultivo puro). Esto implica que cuanto mayor es la biodiversidad de los grupos funcionales del fitoplancton presente, incluso si muchas de las especies que lo conforman son productoras de toxinas, menor es el riesgo para el zooplancton de estuario. Y por tanto, los factores físicos, químicos o antropogénicos que favorezcan el crecimiento de una especie frente a las demás, pueden aumentar la peligrosidad del afloramiento. Según los resultados obtenidos, las tres especies tóxicas tuvieron una similar tolerancia osmótica al agua de baja salinidad, por lo que este hecho podría disminuir ligeramente los efectos de su toxicidad.

7. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos con el presente trabajo pueden obtenerse las siguientes conclusiones.

1. El fitoplancton de agua dulce muestra diferente respuesta a la salinidad en función de su grupo taxonómico (procariota o eucariota), por lo que cambios periódicos o repentinos pueden afectar a la estructura y dinámica de sus poblaciones.
2. El incremento de salinidad sobre *Dyctiosphaerium chlorelloides* provoca una alteración del crecimiento y de la actividad fotosintética, tanto en el balance de oxígeno como en rendimiento del fotosistema II.
3. *Microcystis aeruginosa* es más sensible al estrés salino que *Dictyosphaerium chlorelloides* y responde al aumento de salinidad con inhibición del crecimiento y de la producción de oxígeno.
4. En base a su respuesta en *Artemia* ha quedado patente la existencia de cepas de *Microcystis aeruginosa* de toxicidad elevada (Ma6D y Ma7D), moderada (Ma1D, Ma2D y Ma5D) y de toxicidad no detectable (Ma3D, Ma4D y Ma8D).
5. Respecto a la toxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana* no existen diferencias estadísticamente significativas entre los efectos de las células completas de *Microcystis aeruginosa* y sus extractos.
6. El test Microtox® puede ser una herramienta eficaz en la prevención del riesgo de afloramientos de *Microcystis aeruginosa*, aportando, como cribado previo, una gran ventaja por su rapidez en la obtención de resultados.
7. El fitoplancton marino expuesto a descensos de salinidad presenta una respuesta concentración-dependiente similar en las tres especies tóxicas estudiadas (*Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima* y *Nitzschia sp. N1C1*), tolerando concentraciones de entre 5 y 35 PSU, y diferenciándose en los

parámetros estudiados según sus diferentes mecanismos de aclimatación osmótica.

8. La diatomea *Nitzschia sp. N1C1* tolera mejor el descenso de salinidad que las especies de dinoflagelados estudiados (*Alexandrium minutum* y *Prorocentrum lima*).
9. Los niveles de saxitoxina, ácido okadaico y ácido domoico presentes en afloramientos reales en estuarios son peligrosos para los nauplios de *Artemia franciscana*, y pueden afectar drásticamente a la estructura de la red trófica del estuario.
10. La existencia de afloramientos mixtos (de más de una especie al mismo tiempo) supone una disminución del riesgo toxicológico respecto al presentado por los afloramientos puros, tanto en las tres combinaciones binarias posibles, como en la combinación ternaria, siendo en ésta última el antagonismo ligeramente superior a las anteriores.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agh, N; Van Stappen, G; Bossier, P; Sepehri, H; Lotfi, V; Rouhani, S.M; Sorgeloos, P. (2008) Effects of salinity on survival, growth, reproductive and life span characteristics of *Artemia* populations from Urmia Lake and neighboring lagoons. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Jan 15;11(2):164-72
- Agnieszka, B; Tomasz, C; & Jerzy, W. (2014). Chemical properties and toxicity of soils contaminated by mining activity. *Ecotoxicology (London, England)*, 23(7), 1234–1244. doi:10.1007/s10646-014-1266-y
- Álvarez, O; Tejedor, B. y Vidal, J. (2001). La dinámica de marea en el estuario del Guadalquivir: un caso peculiar de «resonancia antrópica. *Física de la Tierra* 2001, 13, 11-24
- Anderson, D.M; Cembella, A.D; Hallegraeff, M. (2012) Progress in understanding harmful algal blooms: Paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual Review of Marine Science*. 4:143–176
- Anderson, D.M; McGillicuddy, D.Jr; Townsend, D; Turner, J. (2005) The ecology and oceanography of toxic *Alexandrium fundyense* blooms in the Gulf of Maine. *Deep Sea Research II*. 52:2365–2368.
- Asem, A; (2008) Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran, *Journal of Biological Research*, 9: 113-114
- Barbosa, A; Domingues, R.B; Galvão, H.M. (2010) Environmental forcing of phytoplankton in a Mediterranean estuary (Guadiana Estuary, South-western Iberia): A decadal study of anthropogenic and climatic influences. *Estuarine Coastal.*; 33: 324–341.
- Bates, S.S; Gaudet, J; Kaczmarek, I. and Ehrman, J.M. (2004) Interaction between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pn. multiseries* (Hasle) Can bacteria produce D.A. autonomously? *Harmful Algae* 3, 11-20.
- Beattie, K.A; Ressler, J; Wiegand, C; Krause, E; Codd, G.A; Steinberg, C.E.W; Pflugmacher, S. (2003). Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* 62, 219e226.
- Behrenfeld, M.J; Randerson, J.T; McClain, C.R; Feldman, G.C; Los, S.O; Tucker, C.J; Falkowski, P.G; Field, C.B; Frouin, R; Esaias, W.E; Kolber, D.D; Pollack, N.H. (2001) Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science*. Mar 30;291(5513):2594-7.
- Bittencourt-Oliveira, M.C; Hermann, T.C; Cordeir-Araujo, M.K; Macedo-Silva, I; Dias, C.T; Sasaki, F.F. and Moura A.M. (2014) *Brazilian Biology*. Nov 74(4):753-760.

- Blaise, C. (1998). Microbiotesting: An Expanding Field in Aquatic Toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 115-119.
- Boczar, B.A; Beitler, M.K; Liston, J; Sullivan, J. and Cattolico, R.A. (1998) Paralytic shellfish toxins in *Protogonyalulax tamarensis* and *Protogonyalulax catenella* in axenic culture. *Plant physiology*, 88, 1285-1290.
- Bortoli, S; Volmer, D.A. (2014) Account: characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. *European Journal Mass Spectrometry* (Chichester, Eng). 20(1):1-19
- Calić, M; Carić, M; Kršinić, F; Jasprica, N; Pećarević, M. (2013) Controlling factors of phytoplankton seasonal succession in oligotrophic Mali Ston Bay (south-eastern Adriatic). *Environmental Monitoring and Assessment*. 185: 7543–7563
- Cameron, W. M. y Pritchard, D. W. (1963): Estuaries. In *The Sea*, vol 2. John Wiley and Sons.
- Campbell, D. L; Lawton, L. A; Beattie, K. A. and Codd, G. A. (1994), Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*., 9: 71–77
- Carballo, J.L; Hernández-Inda, Z.L; Pérez, P; García-Grávalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2, 17.
- Casabianca, S; Penna, A; Pecchioli, E; Jordi, A; Basterretxea, G. and Vernesi, C. (2012). Population genetic structure and connectivity of the harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Mediterranean Sea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1726), 129–138.
- CDC. Harmful Algal Blooms (HABs) [website]. Atlanta, GA:U.S. Centers for Disease Control and Prevention (updated 24 July 2012). <http://www.cdc.gov/nceh/hsb/hab/default.htm>
- Chen, W.H; Ge, X; Wang, W; Yu, J; & Hu, S. (2009). A gene catalogue for post-diapause development of an anhydrobiotic arthropod *Artemia franciscana*. *BMC Genomics*, 10, 52.
- Cusick, K.D. and Sayler G.S. (2013) An overview in the marine neurotoxin saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*. Mar 27, 11(4):991-1018.

- Dervaux, J; Mejean, A. & Brunet, P. (2015). Irreversible Collective Migration of Cyanobacteria in Eutrophic Conditions. PLoS ONE, 10(3), e0120906. doi:10.1371/journal.pone.0120906
- Falch, B. S; Konig, G. M; Wright, A. D. *et al.* (1995). Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica*. 61: 321-328.
- Falkowsky, P.G. and Raven J.A. (1998) *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA: Blackwell Science, 384pp.
- Fernandes, L. F; Hubbard, K. A; Richlen, M. L; Smith, J; Bates, S. S; Ehrman, J; ... Anderson, D. M. (2014). Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia peragallo* in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research. Part II, Topical Studies in Oceanography*, 103, 139–162
- Gajardo, G. M; & Beardmore, J. A. (2012). The Brine Shrimp *Artemia*: Adapted to Critical Life Conditions. *Frontiers in Physiology*, 3, 185.
- Hallegraeff, G.M. (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*. 46:220–235.
- Halmi, M. I. E; Jirangon, H; Johari, W. L. W; Abdul Rachman, A. R; Shukor, M. Y; & Syed, M. A. (2014). Comparison of Microtox and Xenoassay Light as a Near Real Time River Monitoring Assay for Heavy Metals. *The Scientific World Journal*, 2014, 834202. doi:10.1155/2014/834202
- Heinlaan, M; Kahru, A; Kasemets, K; Kurvet, I; Waterlot, C; Sepp, K; Dubourguier, H.C; Douay, F. (2007) Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests. *Alternatives to Laboratory Animals* Mar;35(1):101-10.
- Ito, E; Kondo, F; Terao, K. and Harada, K.I. (1997) Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon*, 35(9):1453-1457.
- Kinne, R.K.H. (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation: From bacteria to mammals. *Journal of Experimental Zoology*, 265:346-355.
- Kirk, J.T.O. (1994) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems* 2nd. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kotaki, Y; Lundholm, N; Onodera, H; Kobayashi, K; A Bajarias, F.F; Furio, E.F; Iwataki, M; Fukuyo, M. and Kodama, M. (2004) Wide distribution of *Nitzschia navis-varingica*, a new domoic acid-producing benthic diatom found in Vietnam. *Fisheries Science*; 70: 28 – 32.

- Lawton, L.A; Campbell, D.L; Beattie, K.A. and Codd, G.A. (1990) Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. *Letters of Applied Microbiology*. Oct;11(4):205-7.
- MacKintosh, C; Beattie, K.A; Klumpp, S; Cohen, P; Codd, G.A. (1990) Cyanobacterial microcystin L-R is a potent and specific inhibitor of protein-phosphatases 1 and 2A from both mammal and higher plants. *FEBS Letters* 264:187-192.
- Madrigal-Santillán, E; Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I; Sumaya-Martínez, M. T; Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M; ... Morales-González, J. A. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, 20(40), 14787–14804.
- Maniatsi, S; Kappas, I; Baxevanis, A.D; Farmaki, T; Abatzopoulos, T.J. (2009) Sharp phylogeographic breaks and patterns of genealogical concordance in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *International Journal of Molecular Sciences*. Dec 18;10(12):5455-70.
- McLusky, D.S, Elliott M. (2004) *The estuarine ecosystem: ecology, threats and management* New York: Oxford University Press.
- Mueller, J. G; Middaugh, D. P; Lantz, S. E. & Chapman, P. J. (1991). Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1277–1285.
- Neilan, B.A; Dittmann, E; Rouhianen, L; Bass, R.A; Schaub, V; Sivonen, K. and Burner, T. (1999) Non ribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 181(13):4089-4097.
- Nipper, M. (2000). Current approaches and future directions for contaminantrelated impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3, 433e447
- Nunes, B.S; Carvalho, F.D; Guilhermino, L.M; Van Stappen, G. (2006) Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*. Nov;144(2):453-62. Epub May 3.
- OMS. (2011). *Guidelines for drinking-water quality*. Forth edition. Recommendations. World Health Organization, 564 pp ISBN: 978 92 4 154815 1
- Paerl, H. (1996). A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35(6): 25-35.
- Persoone, G. and Wells, P.G. (1987). *Artemia* in aquatic toxicology: A review. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia Research and its*

Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology, vol. I. Universa Press, Wetteren, Belgium.

-Petrucchi, F; Caimi, S; Mura, G; Caroli, S; (1995). *Artemia* as a Test organism of Environmental Contamination by Trace Elements. *Microchemical Journal* 51, 181e186.

-Pistocchi, R; Guerrini, F; Pezzolesi, L; Riccardi, M; Vanucci, S; Ciminiello, P; ... Riccardi, E. (2012). Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 Years of Studies on Cultured Species. *Marine Drugs*, 10(1), 140–162.

-Pulina, S; Padedda, B.M; Satta, C.T; Sechi, N; Luglie A. (2012) Long-term phytoplankton dynamics in a Mediterranean eutrophic lagoon (Cabras Lagoon, Italy). *Plant Systems*. 146:259–272.

-Rai, A. N. (1990). *CRC Handbook of symbiotic cianobacteria*. CRC Press. Boca Ratón. 253 pp.

-Sánchez-Fortún, S; Sanz, F; Barahona, M.V. (1996). Acute Toxicity of Organophosphorous Insecticides and Protection by Cholinergic Antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 391e398.

-Scheurs, H. (1992). *Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology*. Thesis, University of Amsterdam . Holland .

-Tanti, J.F; Gremeaux, T; van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1991) Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein-phosphatases 1 and 2A on glucose transport and metabolism in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 266; 2099-2013.

-Telesh, I.V; Khlebovich, V.V. (2010) Principal processes within the estuarine salinity gradient: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 61(4-6):149-55.

-Tiedeken, J.A; Ramsdel, J.S. and Ramsdel, A.F. (2005) Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology* 27, 711-717.

-USEPA. *National Primary Drinking Water Regulations; and National Secondary Drinking Water Regulations; Analysis and Sampling Procedures; Proposed Rule*. 69. Washington, Wash, USA: United States Environmental Protection Agency (USEPA); (2004). Whole effluent toxicity alternate test procedure—microtox. Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under the clean water act.

-Valdiglesias, V; Prego-Faraldo, M.V; Pásaro, E; Méndez, J; Laffon, B. (2013) Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*. Oct 31;11(11):4328-49.

-Valiela, I. and Fox, S.E. (2008) Ecology. Managing coastal wetlands. Science. Jan18;319(5861):290-1.

-Varó, I; Serrano, R; Pitarch, E; Amat, F; López, F.J; Navarro, J.C. (2000). Toxicity and Bioconcentration of Chlorpyrifos in Aquatic Organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 65, 623e630.

-Vezie, C; Benoufella, F; Sivonen, K; Bertru, G. and Laplanche, A. (1996) Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and MicrotoxR assays compared with mouse bioassay results Phycologia 1996 35:6S, 198-202

-Wera, S. and Hemming, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. Review article. Biochemical Journal, 311:17-29.

-Wikner, J. and Andersson, A. (2012) Increased freshwater discharge shifts the trophic balance in the coastal zone of the Northern Baltic Sea. Global Change Biology 18:2509-2519

-Zhang, M; Duan, H; Shi, X; Yu, Y; Kong, F. (2012) Contributions of meteorology to the phenology of cyanobacterial blooms: Implications for future climate change. Water Research. 46:442–452

FUENTES DE LAS IMÁGENES

<http://www.hab.org.za/>

<http://enfo.agt.bme.hu/>

<http://oswegocountytoday.com/>

<http://biolum.eemb.ucsb.edu/>

<http://www.geo.uu.nl/>

<http://www.fao.org/>

<http://lacienciaysusdemonios.com/>

<http://www.croa.com.ar/>

<http://www.swfwmd.state.fl.us>

